(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 602 030**

(51) Int. CI.:

C12N 15/79 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2013 PCT/EP2013/066065**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020056**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2013 E 13750004 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2880170**

(54) Título: **Método para producir RFc solubles como fusión de Fc con la región Fc de inmunoglobulina inerte y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

02.08.2012 EP 12179025

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2017

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

RUEGER, PETRA;
SCHLOTHAUER, TILMAN y
SEEBER, STEFAN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir RFc solubles como fusión de Fc con la región Fc de inmunoglobulina inerte y usos de los mismos

En el presente documento se publica un método para la producción de receptores Fc solubles como polipéptido de fusión con una región Fc de inmunoglobulina inerte, evitando la autoagregación y usos de los mismos, tal como columnas de cromatografía de RFc, determinación de interacción de RFc de anticuerpos de baja afinidad.

Antecedentes de la invención

Una inmunoglobulina contiene en general dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada una de las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas comprende una región variable (generalmente la porción amino terminal de la cadena polipeptídica) que contiene un dominio de unión que es capaz de interaccionar con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas también comprende una región constante (generalmente la porción carboxilo terminal). La región constante de la cadena pesada participa en la unión de la inmunoglobulina, p. ej., a células que portan un receptor Fc gamma (RFcγ), tales como células fagocitarias, o a células que portan el receptor Fc neonatal (RFcn), también conocido como receptor de Brambell y también participa en la unión de algunos factores incluyendo factores del sistema del complemento clásico tales como en componente (C1q).

Hulett y Hogarth (Hulett, M.D. and Hogarth, P.M., Adv. Immunol. 57 (1994) 1-127) publicaron que los receptores extracelulares para la parte Fc de las inmunoglobulinas de clase G son una familia de glucoproteínas transmembrana que comprende tres tipos de receptores diferentes que tienen diferente especificidad de unión: RFcγI, RFcγII, y RFcγIII. Los receptores de tipo I interactúan con IgG que no está formando complejos, mientras que los receptores de tipo II y III interactúan preferentemente con IgG que está formando complejos.

El RFcγIII humano (CD 16) existe en dos isoformas y dos formas polimórficas. La primera isoforma, RFcγIIIa, es una molécula transmembrana codificada por un gen diferente de la segunda isoforma, RFcγIIIb, la cual es una proteína de membrana fijada a GPI. La forma polimórfica V159 tiene un resto de valina en la posición 159 de las secuencias de aminoácidos, mientras que la forma polimórfica F159 tiene un resto de fenilalanina en la posición 159.

Para la clase IgG de inmunoglobulinas, ADCC y ADCP están gobernadas por la unión de la región Fc con una familia de receptores designada como receptores de Fc gamma (Fcγ) (RFcγ). En los seres humanos, esta familia de proteínas comprende RFcγI (CD64), RFcγII (CD32), que incluye las isoformas RFcγIIA, RFcγIIB y RFcγIIC, y RFcγIII (CD16), que incluye las isoformas RFcγIIIA y RFcγIIIB (Raghavan y Bjorkman, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12 (1996) 181-220; Abes, et al., Expert Reviews (2009) 735-747). Los RFcγ se expresan en una variedad de células inmunitarias y la formación del complejo Fc/RFcγ recluta a estas células hacia los sitios de unión a antígeno, resultando típicamente en señalización y respuestas inmunitarias posteriores tales como liberación de mediadores inflamatorios, activación de linfocitos B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. Además, mientras que RFcγI, RFcγIIA/C y RFcγIIIA son receptores activadores caracterizados por un motivo de activación a base de tirosina del inmunorreceptor intracelular (ITAM, por sus siglas en inglés), RFcγIIIB tiene un motivo inhibidor (ITIM) y es, por tanto, inhibidor. Mientras que RFcγI se une a IgG monomérica con alta afinidad, RFcγIII y RFcγII son receptores de baja afinidad, que interactúan con IgG agregada o en complejos.

La unión de IgG a receptores Fc activadores e inhibidores o al primer componente del complemento (C1q) depende de restos situados en la región bisagra y en el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son críticas para la unión de los RFcγ y del complemento C1q y tienen secuencias exclusivas. La sustitución de restos de IgG1 e IgG2 humanas en las posiciones 233-236 y de restos de IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 redujo enormemente ADCC y CDC (Armour, et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624; Shields, et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604). Idusogie, et al. (J. Immunol 166 (2000) 2571-2575) cartografiaron el sitio de unión de C1q para el anticuerpo terapéutico Rituxan(R) y demostraron que la sustitución Pro329Ala reducía la capacidad de Rituximab de unirse a C1q y activar el complemento. Se ha publicado que la sustitución de la Pro329 con Ala conduce a una unión reducida a los receptores RFcγI, RFcγII y RFcγIIIA (Shields, et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604) pero también se ha descrito que esta mutación presenta una unión de tipo natural a RFcγI y RFcγII y sólo un descenso muy leve de la unión al receptor RFcγIIIA (tabla 1 y tabla 2 en el documento EP 1 068 241, Genentech).

En el documento WO 2010/048313 se publican RFcn recombinante y variantes del mismo para la purificación de proteínas de fusión que contienen Fc. El alto nivel de expresión y secreción de proteínas de fusión Fc-X en células de mamífero lo publican Lo et al. (Lo, K-M., et al., Prot. Eng. 11 (1998) 495-500). Dumont, F.A., et al. (Biodrugs 20 (2006) 151-160) publican fusiones-Fc monoméricas. Huang, C. (Curr. Opin. Biotechnol. 20 (2009) 592-599) publica productos terapéuticos de fusión con receptor Fc, trampas y tecnología MIMETIBODYTM. En el documento WO 01/03737 se publican proteínas de fusión con inmunoglobulina. La expresión y exportación de proteínas antiobesidad como proteínas de fusión Fc se publica en el documento WO 00/40615.

Sumario de la invención

Se ha encontrado que pueden producirse receptores Fc solubles expresando el receptor Fc como polipéptido de fusión con una región Fc que no se une sustancialmente al receptor Fc fusionado. El uso de un polipéptido de fusión para la expresión del receptor Fc aumenta el rendimiento obtenible del receptor Fc, bien en forma de polipéptido de fusión o bien como receptor aislado. Además, el polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento proporciona una mayor flexibilidad para combinar más de una copia de un receptor Fc en una única molécula, p. ej., para una mayor avidez, o para combinar diferentes receptores Fc (de diferente origen, o de diferente tipo, o ambos) en una única molécula.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I

R1-FC-R2 (fórmula I)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,
R2 indica un segundo receptor Fc, y
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,
en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que FC no se une sustancialmente a R1 y/o R2

en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente entre sí de entre el grupo de receptor Fc gamma humano, receptor Fc neonatal humano, receptor Fc murino y receptor Fc neonatal de conejo y
en la que FC es polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G.

En una realización el polipéptido de fusión tiene la fórmula II

R1-SE1-L1-SE2-FC-SE3-L2-SE4-R2 (fórmula II)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,
R2 indica un segundo receptor Fc,
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,
SE1 indica un primer sitio de escisión,
SE2 indica un segundo sitio de escisión,
SE3 indica un tercer sitio de escisión,
SE4 indica un cuarto sitio de escisión,
L1 indica una primera secuencia de aminoácidos de intervención y
L2 indica una segunda secuencia de aminoácidos de intervención,

en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que uno cualquiera de SE1, SE2, SE3, SE4 pueden estar presentes o ausentes independientemente uno de otro,
en la que L1 y L2 pueden estar presentes o ausentes independientemente uno de otro, en la que FC no se une sustancialmente a R1
y/o R2,
en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente entre sí de entre el grupo de receptor Fc gamma humano, receptor Fc neonatal humano, receptor Fc murino y receptor Fc neonatal de conejo y
en la que FC es polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G.

En una realización el receptor Fc gamma se selecciona de entre RFcγI (CD64) humano, RFcγII (CD32) humano, RFcγIIA humano, RFcγIIB humano, RFcγIIC humano, RFcγIII (CD16) humano, RFcγIIIA humano y RFcγIIIB (CD64) humano.

En una realización el receptor Fc neonatal humano es RFcn humano.

En una realización el receptor Fc gamma se selecciona de entre RFcγI (CD64) murino, RFcγII (CD32) murino, RFcγIIB murino, RFcγIII (CD16) murino, RFcγIII-2 (CD16-2) murino y RFcγIV murino.

En una realización uno o más de los receptores Fc son un receptor Fc gamma.

En una realización el polipéptido de región Fc de cadena pesada tiene una mutación de aminoácido en una o más de las posiciones 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 272, 285, 288, 290, 291, 308, 309, 310, 311, 314, 385, 386, 387, 428, 433, 434, 435 y 436.

En una realización uno o más de los receptores Fc son un RFcn.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y/o 447.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana que tiene una unión reducida a RFcn tiene una o más alteraciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 252, 253 254 255 288 309 386 388 400 415 433 435 436 439 y/o 447.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana que tiene una unión reducida a RFcn tiene las mutaciones de aminoácidos I253A, H310A, y H435A,

En una realización la secuencia de aminoácidos de intervención se selecciona de entre un primer grupo que comprende (G3S)3, (G3S)4, (G3S)5, (G3S)6, (G4S)3, (G4S)4, (G4S)5, (G5S)2, (G5S)3 y (G5S)4, o de entre un segundo grupo que comprende marcador Arg, marcador Avi, marcador His-Avi, marcador His, marcador Flag, marcador 3xFlag marcador Strep, marcador Nano marcador SBP, marcador c-myc, marcador s, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, marcador GST, o marcador MBP, o de entre combinaciones de dos elementos de estos grupos.

En una realización, el sitio de escisión se selecciona de entre sitio de escisión de proteasa de proteasa IgA, sitio de escisión de proteasa granzima B, sitio de escisión de proteasa Tev, sitio de escisión de proteasa PreScission, sitio de escisión de trombina, sitio de proteasa Factor 10a, sitio de escisión de proteasa Ides, sitio de escisión de enterocinasa, o un sitio de escisión de proteasa SUMO.

En una realización el polipéptido de fusión no comprende un sitio de escisión de proteasa adicional sino un sitio de escisión de proteasa inherente, tal como un sitio de escisión de papaína, un sitio de escisión de pepsina, o un sitio de escisión de proteasa Ides.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es un polipéptido de fusión dimérico que comprende dos polipéptidos de fusión tal como se publica en el presente documento.

En una realización el primer FC comprende la mutación T366W y opcionalmente la mutación S354C y el segundo FC comprende las mutaciones T366S, L368A y Y407V y opcionalmente la mutación Y349C.

En una realización el polipéptido de fusión se caracteriza por que

a) R1 y R2 del primer y segundo polipéptido son idénticos,
b) R1 y R2 del primer polipéptido de fusión son idénticos, R1 y R2 del segundo polipéptido de fusión son idénticos pero diferentes de R1 y R2 del primer polipéptido de fusión,
c) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y R2 del primer y segundo polipéptido son idénticos pero diferentes de R1,
d) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y ambos R2 están ausentes,
e) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son diferentes y ambos R2 están ausentes,
f) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y ambos R1 están ausentes,
g) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son diferentes y ambos R1 están ausentes,
h) R1 del primer polipéptido de fusión y R2 del segundo polipéptido de fusión son diferentes y R2 el primer polipéptido de fusión está ausente y R1 del segundo polipéptido está ausente.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es un método para la producción de un receptor Fc soluble que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento,
b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o el medio de cultivo,
c) opcionalmente, escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,

produciendo de ese modo un receptor Fc soluble.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado o un polipéptido de fusión dimérico inmovilizado tal como se publica en el presente documento como ligando de cromatografía de afinidad.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado o un polipéptido de fusión dimérico inmovilizado, tal como se publica en el presente documento para determinar la unión al receptor Fc de un anticuerpo.

En una realización el polipéptido de fusión está unido a una fase sólida.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento en la fabricación de un medicamento.

En una realización el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria,

En una realización la enfermedad es una enfermedad caracterizada por niveles de anticuerpos aumentados.

En una realización la enfermedad es una enfermedad autoinmune.

En otra realización la enfermedad es artritis reumatoide.

Descripción detallada de la invención

Descripción de las Figuras

Figura 1 Mapa plasmídico de plásmido de expresión de polipéptido de fusión
Figura 2 Gel de SDS-PAGE analítico de escisión por papaína
Figura 3 Gel de Bis Tris al 12 % +/- DTT; Escisión de RFcgammaIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G con proteasa PreScission (carril 3, 8), respectivamente, proteasa IgA (carril 2, 7): Puede observarse escisión inespecífica con PP (carril 3, 8).
Figura 4 Separación y cuantificación de diferentes formas de glicosilación de un anticuerpo anti-Her (natural, en la parte superior) y un anticuerpo anti-Her modificado por glucoingeniería.
Figura 5 comparación de columna de afinidad usando RFcgammaIIIaV158 y RFcgammaIIIaV158 marcado con Fc.
Figura 6 El sensograma BIAcore de la respuesta del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Fc LALA P329G presenta más de 100 unidades de respuesta en comparación con el RFcgammaIIIaV158 con 40 UR; RFcγIIIa V158_008 indica el polipéptido de fusión no escindido, RFcγIIIa V158_007 indica una variante no funcional acortada del RFcγIIIa (=control), RFcγIIIa V158_jf323 indica el marcador HisAvi intacto que comprende la variante funcional de RFcγIIIa.
Figura 7 Sensogramas del polipéptido de fusión receptor Fcgamma V158-FcLALA P329G (figura 7a), receptor Fcgamma V158 (figura 7b), polipéptido de fusión receptor Fcgamma V158-Fc LALA P329G escindido (figura 7c), polipéptido de fusión receptor Fcgamma V158-Fc LALA P329G no funcional (figura 7d) (=control).

Definiciones

La expresión "unión a un receptor Fc" indica la unión de una región Fc a un receptor Fc en, por ejemplo, un ensayo BIAcore(R) (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

En el ensayo BIAcore(R) el receptor Fc se une a una superficie y la unión del analito, p. ej., un polipéptido de fusión que comprende la región Fc o un anticuerpo, se mide mediante resonancia de plasmón superficial (RPS). La afinidad de la unión se define mediante los términos ka (constante de asociación: velocidad constante para la asociación del polipéptido de fusión de región Fc o conjugado para formar un complejo región Fc/receptor Fc), kd (constante de disociación: velocidad constante para la disociación del polipéptido de fusión de región Fc o conjugado a partir de un complejo región Fc/receptor Fc) y KD (kd/ka). Como alternativa, la señal de unión de un sensograma de RPS puede compararse directamente con la señal de respuesta de una referencia, con respecto a la altura de la señal de resonancia y los comportamientos de disociación.

La expresión "dominio CH2" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 231 hasta la posición EU 340 (sistema de numeración EU de acuerdo con Kabat). En una realización un dominio CH2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 01 (APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFN- WYVDG VEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAK). El dominio CH2 es exclusivo en cuanto a que no está apareado estrechamente con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidrato ramificadas N-ligadas se interponen entre los dos dominios CH2 de una región Fc nativa. Se ha especulado que el carbohidrato podría proporcionar un sustituto para el apareamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206.

La expresión "dominio CH3" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 341 hasta la posición EU 446. En una realización el dominio CH2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº:02 (GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG).

El término "clase" de un anticuerpo indica el tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden subdividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p.ej., IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 and IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

La expresión "región Fc" indica la región C-terminal de una inmunoglobulina. La región Fc es una molécula dimérica que comprende dos polipéptidos de región Fc de cadena pesada de anticuerpo unidos por enlace disulfuro (cadenas polipeptídicas de región Fc). Una región Fc puede generarse mediante digestión con papaína, o digestión con IdeS, o digestión con tripsina de un anticuerpo intacto (de longitud completa) o puede producirse de forma recombinante.

La región Fc obtenible a partir de un anticuerpo o inmunoglobulina de longitud completa comprende los restos del 226 (Cys) al extremo C de la cadena pesada de longitud completa y, por tanto, comprende una parte de la región bisagra y dos o tres dominios constantes, es decir, un dominio CH2, un dominio CH3 y opcionalmente un dominio CH4. Se sabe a partir de los documentos US 5.648.260 y US 5.624.821 que la modificación de restos de aminoácidos definidos en la región Fc resulta en efectos fenotípicos.

La formación de la región Fc dimérica que comprende dos fragmentos de cadena pesada de anticuerpo idénticos o no idénticos está mediada por la dimerización no covalente de los dominios CH3 comprendidos (para los restos de aminoácidos implicados véase, p. ej., Dall'Acqua, Biochem. 37 (1998) 9266-9273). La región Fc se estabiliza de forma covalente mediante la formación de enlaces disulfuro en la región bisagra (véase, p. ej., Huber, et al., Nature 264 (1976) 415-420; Thies, et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 67-79). La introducción de cambios de restos de aminoácidos dentro del dominio CH3 a fin de alterar las interacciones de la dimerización de dominios CH3-CH3 no afecta de forma adversa a la unión de RFcn debido a la localización de los restos implicados en la dimerización de dominios CH3-CH3 que se sitúan en la interfaz inerte del dominio CH3, mientras que los restos implicados en la interacción región Fc-RFcn se sitúan en el exterior del dominio CH3-CH3.

Las funciones efectoras asociadas con la región Fc se inician mediante la interacción de la región Fc con receptores de superficie celular específicos de función efectora de la región Fc. La mayoría de los anticuerpos del isotipo IgG1 pueden ejercer activación del receptor, mientras que los anticuerpos de los isotipos IgG2 e IgG4 no tienen función efectora o tienen función efectora limitada.

Los receptores que inducen función efectora son los tipos (y subtipos) de receptor Fc RFcγI, RFcγII y RFcγIII. Las funciones efectoras asociadas con un isotipo IgG1 pueden reducirse introduciendo cambios de aminoácidos específicos en la región bisagra inferior, tales como L234A y/o L235A, que están implicados en la unión de RFcγ y C1q. Asimismo, ciertos restos de aminoácidos, situados especialmente en el dominio CH2 y/o CH3, están asociados con la semivida circulante de una molécula de anticuerpo o un polipéptido de fusión de región Fc en el torrente sanguíneo. La semivida circulatoria está determinada por la unión de la región Fc al receptor Fc neonatal (RFcn).

La numeración de los restos de aminoácidos en la región constante de un anticuerpo se hace de acuerdo con el índice EU de Kabat (Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.).

La expresión "región Fc de origen humano" indica la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina de origen humano que contiene al menos una parte de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG se extiende desde la Cys226, o desde la Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar o no presente. A menos que se especifique de otra forma en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación de los NIH 91-3242,

La expresión "porción de unión a RFcn de una región Fc" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 243 hasta la posición EU 161 y aproximadamente desde la posición EU 275 hasta la posición EU 293 y aproximadamente desde la posición EU 302 hasta la posición EU 319 y aproximadamente desde la posición EU 336 hasta la posición EU 348 y aproximadamente desde la posición EU 367 hasta la posición EU 393 y la posición EU 408 y aproximadamente desde la posición EU 424 hasta la posición EU 440. En una realización, uno o más de los siguientes restos de aminoácidos de acuerdo con la numeración de Kabat están alterados: F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437,

Q438, K439 y S440 (numeración EU).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana natural del isotipo IgG1 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 03).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 04).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con las mutaciones T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 05).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 06).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 07).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 08).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 09).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A y P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación P239G y T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG 1 con una mutación P329G y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y T366S, L368A e Y407V tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y T366W tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana natural del isotipo IgG4 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 15).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG4 con una mutación S228P y L235E tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 16).

Una cadena de polipéptido de una región Fc humana variante del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E y P329G tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED
PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLGSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 17).

La expresión "receptor Fc", abreviado como "RFc", indica un receptor que se une una región Fc. En una realización el RFc es una secuencia nativa de RFc humano. Además, en una realización el RFc es un RFc que se une a un anticuerpo IgG (un receptor Fc gamma) e incluye receptores de las subclases RFcγI, RFcγII, y RFcγIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de los mismos. Los receptores RFcγII incluyen RFcγIIA (un "receptor activador") y RFcγIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. Los RFc se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9 (1991) 457-492, Capel, et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34, de Haas, et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341. El término "FcR" del presente documento abarca otros RFc. El término también incluye el receptor neonatal, RFcn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (véase p. ej., Guyer et al, et al., J. Immunol. 117 (1976) 587; Kim, et al., J. Immunol. 24 (1994) 249).

La expresión "receptor Fc gamma", abreviado como "RFcγ" o "RFcgamma", indica cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y están codificadas por un gen RFcγ. En los seres humanos, esta familia incluye pero no se limita a RFcγI (CD64), incluyendo las isoformas RFcγIA, RFcγIB y RFcγIC, RFcγII (CD32), incluyendo las isoformas RFcγIIA (incluyendo los alotipos H131 y R131), RFcγIIB (incluyendo RFcγIIB-1 y RFcγIIB-2) y RFcγIIc, y RFcγIII (CD16), incluyendo las isoformas RFcγIIIA (incluyendo los alotipos V158 y F158; entrada P08637 de Swiss-Prot; Extremo N-MRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKLDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLI SSQASSYFIDAATVDDSGEYRC-QTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVF KEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKLGRKYFHHNSDFYIP-KATLKDSG SYFCRGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQ-Extremo C; SEQ ID NO: 18) y RFcγIIIb (incluyendo los alotipos RFcγIIB-NA1 and RFcγIIB-NA2) (véase p. ej., Jefferis et al., Immunol. Lett. 82 (2002) 57-65, incorporado totalmente por referencia), así como isoformas o alotipos de RFcγ. Un RFcγ puede ser de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitarse a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los RFcγ de ratón incluyen no se limitan a RFcγI (CD64), RFcγII (CD32), RFcγIII (CD16), y RFcγIII-2 (CD16-2), así como isoformas o alotipos de RFcγ. Los restos de aminoácidos implicados en la interacción región Fc-RFcγ son 234-239 (región bisagra inferior), 265-269 (bucle B/C), 297-299 (bucle D/E), y 327-332 bucle (F/G) (Sondermann, et al., Nature 406 (2000) 267-273). Las mutaciones de aminoácidos que resultan en una unión/afinidad disminuida por el RFcγI, RFcγIIA, RFcγIIB y/o RFcγIIIA incluyen N297A (de forma concomitante con una inmunogenicidad disminuida y semivida de unión/afinidad prolongada) (Routledge, et al., Transplantation 60 (1995) 847; Friend et al., Transplantation 68 (1999) 1632; Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (1995) 6591), los restos 233-236 (Ward y Ghetie, Ther. Immunol. 2 (1995) 77; Armour et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613). Algunas sustituciones de aminoácidos de ejemplo se describen en los documentos US 7.355.008 y US 7.381.408.

La expresión "receptor Fc neonatal", abreviado como "RFcn", indica na proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada al menos en parte por un gen RFcn. El RFcn puede ser de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitarse a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Tal como se sabe en la técnica, la proteína funcional RFcn comprende dos polipéptidos, a menudo denominados como la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada está codificada por el gen RFcn. A menos que se indique de otra forma en el presente documento, RFcn o una proteína RFcn se refiere al complejo de cadena pesada de RFcn con beta-2-microglobulina. Los restos de aminoácidos de la región Fc que interaccionan con el RFcn están

cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los restos de contacto región Fc-RFcn están todos dentro de una única cadena pesada de IgG. Los restos de aminoácidos implicados son 248, 250-257, 272 285 288 290-291, 308-311 y 314 (todos en el dominio CH2) y los restos de aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 (todos en el dominio CH3). Las mutaciones de aminoácidos que resultan en una unión/afinidad aumentada por el RFc incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591).

Los restos de aminoácidos del receptor Fc neonatal que están conservados entre especies son los restos de histidina en la posición 310 y 435 en la región Fc. Estos restos son responsables de la dependencia del pH de la interacción región Fc-RFcn (véase, p. ej., Victor, G., et al., Nature Biotechnol. 15 (1997) 637-640); Dall'Acqua, W. F., et al. J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180). Las mutaciones de la región Fc que atenúan la interacción con RFcn pueden reducir la semivida del anticuerpo.

La expresión "región bisagra" indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se une al dominio CH1 y el dominio CH2, p. ej., desde alrededor de la posición 216 hasta la posición alrededor de 230 de acuerdo con el sistema EU de numeración de Kabat. La región bisagra es normalmente una molécula dimérica que consiste en dos polipéptidos con idéntica secuencia de aminoácidos. La región bisagra comprende alrededor de 25 restos de aminoácidos y es flexible, permitiendo que las regiones de unión a antígeno se muevan de forma independiente. La región bisagra puede subdividirse en tres dominios: el dominio de bisagra superior, el medio y el inferior (Roux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083).

La expresión "región bisagra inferior" de una región Fc indica el tramo de restos de aminoácidos en posición C-terminal con respecto a la región bisagra, es decir, los restos 233 a 239 de la región Fc de acuerdo con la numeración EU de Kabat.

La expresión "región Fc natural" indica una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas naturales incluyen una región Fc de IgG humana nativa (alotipos no A y A), región Fc de IgG2 humana nativa, región Fc de IgG3 humana nativa, y región Fc de IgG4 humana nativa así como variantes de origen natural de las mismas.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en esta sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un principio activo, que es atóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

La expresión "polipéptido" indica un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos tanto de forma natural como sintética. Los polipéptidos de menos de alrededor de 20 aminoácidos pueden denominarse como "péptidos", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 restos de aminoácidos pueden denominarse como "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos, o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden ser añadidos por la célula en la que se expresa el polipéptido y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en cuanto a su estructura de cadena principal o el ácido nucleico que codifica la misma. En general, las adiciones tales como grupos carbohidrato no se especifican, pero aun así, pueden estar presentes.

La expresión "marcador de secuencia de aminoácidos" indica una secuencia de restos de aminoácidos conectados entre sí por medio de enlaces peptídicos que tiene propiedades de unión especiales. En una realización el marcador de secuencia de aminoácidos es un marcador de afinidad o de purificación. En una realización el marcador de secuencia de aminoácidos se selecciona de entre el grupo que comprende marcador tag, marcador His, marcador Avi, marcador His-Avi, marcador Flag, marcador 3xFlag marcador Strep, marcador Nano marcador SBP, marcador c-myc, marcador s, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, marcador GST, y marcador MBP, En una realización el marcador de secuencia de aminoácidos se selecciona de entre el grupo que comprende la SEQ ID NO: 19 (RRRRR), SEQ ID NO: 20 (RRRRRR), SEQ ID NO: 21 (marcador Avi), SEQ ID NO: 22 (marcador His-Avi), SEQ ID NO: 23 (HHHHHH), SEQ ID NO: 24 (KDHLIHNVHKEFHAHAHNK), SEQ ID NO: 25 (DYKDDDDK), SEQ ID NO: 26 (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK), SEQ ID NO: 27 (AWRHPQFGG), SEQ ID NO: 28 (WSHPQFEK), SEQ ID NO: 29 (MDVEAWLGAR), SEQ ID NO: 30 (MDVEAWLGARVPLVET), SEQ ID NO: 31 (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP), SEQ ID NO: 32 (EQKLISEEDL), SEQ ID NO: 33 (KETAAAKFERQHMDS), SEQ ID NO: 34 (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), SEQ ID NO: 35 (dominio de unión a celulosa) SEQ ID NO: 36 (dominio de unión a celulosa) SEQ ID NO: 37 (TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNG-KTYKCLQPHTSLAGWEP SNVPALWQLQ), SEQ ID NO: 38 (marcador GST), y SEC ID NO: 39 (marcador MBP).

La expresión "sitio de escisión enzimática" indica una secuencia de restos de aminoácidos conectados entre sí por medio de enlaces peptídicos que pueden escindirse de forma específica mediante una proteasa. En una realización la proteasa es proteasa IgA, granzima B, proteasa Tev, proteasa PreScission, trombina, Factor 10a, proteasa Ides, o

enterocinasa.

La expresión "proteasa IgA" indica una proteasa procedente de *Neisseria gonorrhoeae* con un sitio de reconocimiento que comprende una de las siguientes secuencias en las que "↓" indica la posición del enlace roto:

Pro-Ala-Pro ↓ Ser-Pro (SEQ ID NO: 40),
Pro-Pro ↓ Ser-Pro (SEQ ID NO: 41),
Pro-Pro ↓ Ala-Pro (SEQ ID NO: 42),
Pro-Pro ↓ Thr-Pro (SEQ ID NO: 43),
Pro-Pro ↓ Gly-Pro (SEQ ID NO: 44),
Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Thr-Pro (SEQ ID NO: 45),
Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Ala-Pro (SEQ ID NO: 46),
Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Ser-Pro (SEQ ID NO: 47),
Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Thr-Pro (SEQ ID NO: 48),
Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Gly-Pro (SEQ ID NO: 49),
Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Thr-Pro (SEQ ID NO: 50),
Ala-Pro-Pro-Ala ↓ Ala-Pro (SEQ ID NO: 51),
Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Ala-Pro (SEQ ID NO: 52),
Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Ser-Pro (SEQ ID NO: 53),
Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Gly-Pro (SEQ ID NO: 54).

El término "engarzador" o la expresión "engarzador peptídico" tal como se usa dentro de esta solicitud indican engarzadores peptídicos de origen natural y/o sintético. Consisten en una cadena de aminoácidos lineal en la que los 20 aminoácidos de origen natural son los bloques de construcción monoméricos. La cadena tiene una longitud de 1 a 50 aminoácidos, preferida entre 1 y 28 aminoácidos, preferida especialmente entre 3 y 25 aminoácidos. El engarzador puede contener secuencias de aminoácidos repetitivas o secuencias de polipéptidos de origen natural, tales como polipéptidos con una función de bisagra. El engarzador tiene la función de garantizar que un péptido conjugado con un anticuerpo anti CD4 pueda realizar su actividad biológica permitiendo que el péptido se pliegue correctamente y se presente adecuadamente. Preferentemente, el engarzador es un "engarzador peptídico sintético" que se diseña para ser rico en restos de glicina, glutamina, y/o serina. Estos restos se disponen p. ej., en unidades repetitivas pequeñas de hasta cinco aminoácidos, tales como GGGGS, QQQQG, o SSSSG. La unidad repetitiva pequeña puede repetirse de dos a cinco veces para formar una unidad multimérica. En los extremos amino y/o carboxilo terminales de la unidad multimérica pueden hasta seis aminoácidos de origen natural arbitrarios adicionales. Otros engarzadores peptídicos sintéticos están compuestos de un único aminoácido, que se repite entre 10 y 20 veces y puede comprender en el en el extremo amino y/o carboxilo terminal hasta seis aminoácidos de origen natural arbitrarios adicionales. Todos los engarzadores peptídicos pueden estar codificados por una molécula de ácido nucleico y, por lo tanto, pueden expresarse de forma recombinante.

Polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento

Se ha encontrado que pueden producirse receptores Fc solubles expresando el receptor Fc como polipéptido de fusión con una región Fc que no se une sustancialmente al receptor Fc fusionado.

La expresión "no se une sustancialmente al receptor Fc" indica que la región Fc con la cual se fusiona el receptor Fc no se une al receptor Fc hasta tal medida que se formen agregados.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I

R1-FC-R2 (fórmula I)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,
R2 indica un segundo receptor Fc, y
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,

en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que FC no se une sustancialmente a R1 y/o R2

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II

R1-SE1-L1-SE2-FC-SE3-L2-SE4-R2 (fórmula II)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,

R2 indica un segundo receptor Fc,
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,
SE1 indica un primer sitio de escisión,
SE2 indica un segundo sitio de escisión,
SE3 indica un tercer sitio de escisión,
SE4 indica un cuarto sitio de escisión,
L1 indica una primera secuencia de aminoácidos de intervención y
L2 indica una segunda secuencia de aminoácidos de intervención,

en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que uno cualquiera de SE1, SE2, SE3, SE4 pueden estar presentes o ausentes independientemente uno de otro, en la que L1 y L2 pueden estar presentes o ausentes independientemente uno de otro, en la que FC no se une sustancialmente a R1 y/o R2.

Los receptores Fc contenidos en los polipéptidos de fusión tal como se publica en el presente documento pueden ser cualquier receptor Fc de cualquier especie incluyendo, pero sin limitarse al ser humano, ratón, rata, conejo y mono.

En una realización el receptor Fc se selecciona de entre el grupo que comprende receptor Fcgamma y receptor Fc neonatal. En una realización el receptor Fc es receptor Fcgamma humano, receptor Fc neonatal humano, receptor Fc murino y receptor Fc neonatal de conejo.

En una realización el receptor Fc gamma humano se selecciona de entre RFcγI (CD64) humano, RFcγII (CD32) humano, RFcγIIA humano, RFcγIIB humano, RFcγIIC humano, RFcγIII (CD16) humano, RFcγIIIA humano, y RFcγIIIB humano.

En una realización el receptor Fc neonatal humano es RFcn humano.

En una realización el receptor Fc gamma murino se selecciona de entre RFcγI (CD64) murino, RFcγII (CD32) murino, RFcγIIB murino, RFcγIII (CD16) murino, RFcγIII-2 (CD16-2) murino y RFcγIV murino.

El FC puede ser una variante de un polipéptido de cadena pesada seleccionado de entre el grupo de polipéptido de cadena pesada de IgG humana, polipéptido de cadena pesada de IgG murina, polipéptido de cadena pesada de IgG de conejo.

El FC puede ser una variante de un polipéptido de cadena pesada seleccionado de entre el grupo de polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG2 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG3 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG1 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG2 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG2a murina, polipéptido de cadena pesada de IgG3 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG de conejo.

Como la región Fc comprendida en el polipéptido de fusión, tal como se publica en el presente documento, no se unirá sustancialmente a ninguno de los receptor(es) Fc fusionado(s) a la misma.

En una realización el polipéptido de fusión no posee sustancialmente ninguna función efectora, lo cual lo hace un candidato deseable para aplicaciones en las cuales ciertas funciones efectoras son innecesarias o nocivas. Pueden llevarse a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/eliminación de funciones efectoras. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión al receptor Fc (RFc) para garantizar que el polipéptido de fusión carece de unión a RFcγ (careciendo, por tanto, probablemente de actividad ADCC). Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, expresan únicamente RFcγIII, mientras que los monocitos expresan RFcγI, RFcγII y RFcγIII. La expresión de RFc en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC en una molécula de interés se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.500.362 (véase, p.ej., Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82 (1985) 1499-1502); la patente de EE.UU. n.º. 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, p.ej., en un modelo animal, tal como el que se desvela en Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95 (1998) 652-656. También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y de eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, p.ej., Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006: 1759-1769).

Las afinidades y propiedades de unión de una región Fc por su ligando pueden determinarse mediante una variedad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar interacciones región Fc/RFc es decir, unión específica de una región Fc a un RFcγ incluyendo pero sin limitarse a,

métodos de equilibrio (p. ej., ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinéticas (p. ej., análisis BIACORE®) y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, incluyendo transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (p. ej., filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar un marcador en uno o más de los componentes que se están examinando y/o emplear una variedad de métodos de detección incluyendo pero sin limitarse a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicos. Puede encontrarse una descripción detallada de afinidades de unión y cinética en Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4ª Ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999).

En una realización FC es una región Fc de origen humano de la subclase IgG1, que está modificada de tal manera que no hay ninguna unión a receptor Fcγ (p. ej., RFcγIIIa). En una realización FC es una región Fc de origen humano, especialmente una región Fc mutada de subclase IgG1 humana. En una realización FC es de la subclase IgG1 humana con mutaciones L234A y L235A. Mientras que IgG4 muestra unión reducida al receptor Fcγ (RFcγIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran unión fuerte. Sin embargo Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y/o His435 son restos que, si se alteran, también proporcionan unión reducida al receptor Fcγ (Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434). En una realización FC es con respecto a la unión al receptor Fcγ de la subclase IgG1, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización FC comprende una o más de las mutaciones S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en código de aminoácidos de una letra) desde la posición de aminoácido 233 hasta 236 de IgG1 o EFLG de IgG4 está sustituida por PVA). En una realización las mutaciones son L234A y L235A para IgG 1.

Los sitios de unión de la región Fc se conocen en el estado de la técnica y los describen, p. ej., Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; y el documento EP 0 307 434; Los sitios de unión de la región Fc se caracterizan, p. ej., por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Las regiones Fc con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE.UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc llamado "DA" con sustitución del resto 265 y el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de restos 265 y 297 a alanina (patente de EE.UU. 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de región Fc con unión mejorada o disminuida a RFc. (Véanse, p.ej., la Patente de EE.UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312, y Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)

En algunas realizaciones, se efectúan alteraciones en la región Fc que resultan en unión de C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, bien mejorada, o bien disminuida), p.ej., tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642, e Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Véanse también Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; los documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y el documento WO 94/29351 relativos a otros ejemplos de variantes de región Fc.

En una realización el polipéptido de región Fc de cadena pesada tiene una mutación de aminoácido en una o más de las posiciones 234, 235, 236, 237, 238, 239, 253, 254, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 288, 297, 298, 299, 307, 311, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 434 y 435. En una realización el uno o más de los receptores Fc es un receptor Fc gamma.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 233, 234, 235, 236, 265, 297, 329, y 331.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene una o más de las mutaciones de aminoácidos E233P, L234A, L235A, L235E, AG236, D265A, N297A, N297D, P329A, P329G y P331S.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene las mutaciones de aminoácidos L234A y L235A y una o más de E233P, L235E, AG236, D265A, N297A, N297D, P329A, P329G y P331S.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene las mutaciones de aminoácidos L234A y L235A y una o más de EP329A o P329G.

En una realización el polipéptido de región Fc de cadena pesada tiene una mutación de aminoácido en una o más de las posiciones 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 272, 285, 288, 290, 291, 308, 309, 310, 311, 314, 385, 386, 387, 428, 433, 434, 435, y 436. En una realización el uno o más de los receptores Fc es un RFcn.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y/o 447.

En una realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana que tiene una unión reducida a RFcn tiene una o más alteraciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 y/o 447.

El polipéptido de fusión puede comprender un polipéptido engarzador entre el receptor Fc y la región Fc. Este polipéptido engarzador puede usarse para ajustar la distancia entre el receptor Fc y la región Fc para permitir que ambas regiones funcionen de la manera planeada.

En una realización el polipéptido engarzador se selecciona de entre el grupo que comprende (G3S)3, (G3S)4, (G3S)5, (G3S)6, (G4S)3, (G4S)4, (G4S)5, (G5S)2, (G5S)3 y (G5S)4 y cualquier combinación de los mismos.

Además, El polipéptido de fusión puede comprender un marcador entre el receptor Fc y la región Fc, p. ej., adecuado para la purificación por afinidad o inmovilización.

En una realización el marcador se selecciona de entre el grupo que comprende marcador Arg, marcador Avi, marcador His-Avi, marcador His, marcador Flag, marcador 3xFlag marcador Strep, marcador Nano marcador SBP, marcador c-myc, marcador s, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, marcador GST, marcador MBP, estreptavidina o avidina, biotina, lectina, polisacárido, esteroide, proteína de unión a esteroide, hormona y receptor de hormona.

El polipéptido engarzador y el marcador pueden combinarse en una secuencia de aminoácidos de intervención que está situada entre el receptor Fc y la región Fc.

En una realización la secuencia de aminoácidos de intervención se selecciona de entre un primer grupo que comprende (G3S)3, (G3S)4, (G3S)5, (G3S)6, (G4S)3, (G4S)4, (G4S)5, (G5S)2, (G5S)3, y (G5S)4, o de entre un segundo grupo que comprende marcador Arg, marcador Avi, marcador His-Avi, marcador His, marcador Flag, marcador 3xFlag marcador Strep, marcador Nano marcador SBP, marcador c-myc, marcador s, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, marcador GST, o marcador MBP, o de entre combinaciones de dos elementos de estos grupos.

La secuencia de aminoácidos de intervención puede estar situada, bien antes o bien después de un sitio de escisión en el polipéptido de fusión.

En una realización el sitio de escisión es un sitio de escisión enzimática. En una realización el sitio de escisión se selecciona de entre el grupo que consiste en sitio de escisión de proteasa de proteasa IgA, sitio de escisión de proteasa granzima B, sitio de escisión de proteasa Tev, sitio de escisión de proteasa PreScission, sitio de escisión de trombina, sitio de proteasa Factor 10a, sitio de escisión de proteasa Ides, sitio de escisión de proteasa SUMO y sitio de escisión de enterocinasa. En una realización el sitio de escisión se selecciona de entre el grupo que consiste en sitio de escisión de proteasa IgA, sitio de escisión de proteasa PreScission, sitio de escisión de granzima B, y sitio de escisión de proteasa Ides.

En una realización el polipéptido de fusión comprende un sitio de escisión inherente de la proteasa papaína, o de la proteasa pepsina, o de la proteasa Ides.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es un polipéptido de fusión dimérico que comprende dos polipéptidos de fusión tal como se publica en el presente documento.

Como el polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento comprende una región Fc que a su vez comprende una región bisagra de inmunoglobulina, el polipéptido de fusión dimérico comprende uno o más puentes disulfuro que unen covalentemente el primer polipéptido de fusión con el segundo polipéptido de fusión.

El polipéptido de fusión dimérico puede ser un polipéptido de fusión homodimérico o un polipéptido de fusión heterodimérico.

Además, el polipéptido de fusión dimérico puede comprender un primer polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I

R1-FC-R2 (fórmula I)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,
R2 indica un segundo receptor Fc, y
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,

en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que FC no se une sustancialmente a R1 y/o R2
o de acuerdo con la fórmula II

R1-SE1-L1-SE2-FC-SE3-L2-SE4-R2 (fórmula II)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,
R2 indica un segundo receptor Fc,
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,
SE1 indica un primer sitio de escisión,
SE2 indica un segundo sitio de escisión,
SE3 indica un tercer sitio de escisión,
SE4 indica un cuarto sitio de escisión,
L1 indica una primera secuencia de aminoácidos de intervención y
L2 indica una segunda secuencia de aminoácidos de intervención,

en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que uno cualquiera de SE1, SE2, SE3, SE4 pueden estar presentes o ausentes independientemente uno de otro, en la que L1 y L2 pueden estar presentes o ausentes independientemente uno de otro, en la que FC no se une sustancialmente a R1
y/o R2,
en la que el primer y el segundo polipéptido de fusión del polipéptido de fusión dimérico pueden seleccionarse independientemente uno de otro de la fórmula I y la fórmula II.

Si el polipéptido de fusión dimérico puede comprender dos polipéptidos de fusión diferentes, hay que usar un mecanismo para garantizar la heterodimerización.

En una realización el primer FC comprende la mutación T366W y opcionalmente la mutación S354C y el segundo FC comprende las mutaciones T366S, L368A y Y407V y opcionalmente la mutación Y349C.

En una realización el polipéptido de fusión se caracteriza por que

a) R1 y R2 del primer y segundo polipéptido son idénticos,
b) R1 y R2 del primer polipéptido de fusión son idénticos, R1 y R2 del segundo polipéptido de fusión son idénticos pero diferentes de R1 y R2 del primer polipéptido de fusión,
c) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y R2 del primer y segundo polipéptido son idénticos pero diferentes de R1,
d) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y ambos R2 están ausentes,
e) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son diferentes y ambos R2 están ausentes,
f) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y ambos R1 están ausentes,
g) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son diferentes y ambos R1 están ausentes,
h) R1 del primer polipéptido de fusión y R2 del segundo polipéptido de fusión son diferentes y R2 el primer polipéptido de fusión está ausente y R1 del segundo polipéptido está ausente.

Aplicaciones del polipéptido de fusión tal como se publican en el presente documento

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado tal como se publica en el presente documento como ligando de cromatografía de afinidad.

En una realización el polipéptido de fusión está unido a una fase sólida. En una realización la fase sólida es un material cromatográfico. En una realización el polipéptido de fusión está biotinilado y la fase sólida está derivatizada con estreptavidina.

En una realización el polipéptido de fusión comprende un sitio de escisión entre el receptor Fc y la región Fc. En una realización el polipéptido de fusión se escinde antes de la biotinilación.

En una realización el polipéptido de fusión comprende un marcador de inmovilización entre el receptor Fc y el sitio de escisión. En una realización el marcador de inmovilización es un marcador His-Avi.

También se publica una columna de cromatografía de afinidad que comprende una matriz y grupos cromatográficos unidos a la matriz, caracterizada por que el grupo funcional cromatográfico unido a la matriz comprende un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento.

En una realización el polipéptido de fusión comprende un sitio de escisión entre el receptor Fc y la región Fc. En una realización el polipéptido de fusión se escinde antes de la biotinilación.

En una realización el polipéptido de fusión comprende un marcador de inmovilización entre el receptor Fc y el sitio de escisión. En una realización el marcador de inmovilización es un marcador Avi.

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado tal como se publica en el presente documento para determinar la unión al receptor Fc de un anticuerpo.

[En una realización el anticuerpo es un anticuerpo de baja afinidad.

En una realización la determinación es mediante resonancia de plasmón superficial. En una realización, el anticuerpo es capturado por un receptor Fc monomérico. En una realización, el anticuerpo es capturado por un anticuerpo dimérico.

Métodos recombinantes

Un aspecto tal como se publica en el presente documento es un método para la producción de un receptor Fc soluble que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento,
b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o el medio de cultivo,
c) opcionalmente, escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,

y producir de ese modo un receptor Fc soluble.

Los métodos y técnicas conocidos para un experto en la técnica, que son útiles para llevar a cabo la presente invención, se describen, p. ej., en Ausubel, F.M., ed., Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I a III (1997), Wiley and Sons; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento puede expresarse en una célula anfitriona. Tras la expresión recombinante, el polipéptido de fusión puede purificarse mediante métodos conocidos en la técnica por el experto en la técnica. Estos métodos están bien establecidos y se usan ampliamente para la purificación de inmunoglobulina y se emplean, bien solos o bien en combinación. Dichos métodos son, por ejemplo, cromatografía de afinidad que usa proteínas de origen microbiano (p. ej., cromatografía de afinidad en proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (p. ej., intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y cromatografía de intercambio de modo mixto), adsorción tiófila (p. ej., con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (p. ej., con fenilsefarosa, resinas aza-arenófilas, o ácido m-aminofenil borónico), cromatografía de afinidad por quelato metálico (p. ej., con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y métodos electroforéticos preparatorios (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102). El polipéptido de fusión puede escindirse antes de la purificación cromatográfica o después de la purificación cromatográfica a fin de liberar el receptor Fc. Los casetes de expresión comprenden un promotor, un segmento de ADN que codifica una secuencia señal de secreción, el gen estructural y una señal terminadora/de poliadenilación. Los elementos se ensamblan en forma ligada operativamente bien en un plásmido que codifica todos los polipéptidos de fusión diferentes necesarios, o en dos o más plásmidos que codifican cada uno un polipéptido de fusión. Para la expresión de los genes estructurales el(los) plásmido(s) se introducen en una célula anfitriona adecuada. Las proteínas se producen en células de mamífero tales como células CHO, células NS0, células Sp2/0 , células COS, células HEK, células K562, células BHK, células PER.C6® y similares. En una realización el polipéptido de fusión se expresa en una célula CHO, o una célula BHK, o una célula HEK. Los elementos reguladores del plásmido tienen que seleccionarse de manera que sean funcionales en la célula anfitriona seleccionada. Los polipéptidos de fusión expresados están ensamblados funcionalmente.

Un "plásmido de expresión" es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos necesarios para la expresión del(los) gen(es) estructural(es) comprendidos en una célula anfitriona. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación plasmídica procariota, p.ej., para *E. coli*, que comprende un origen de replicación y un marcador seleccionable, un marcador de selección eucariota y uno o más casetes de expresión para la expresión del(los) gen(es) estructural(es) de interés, comprendiendo cada uno de ellos un promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción incluyendo una señal de poliadenilación. La expresión génica suele situarse bajo el control de un promotor y se dice que dicho gen estructural está "unido operativamente" al promotor. De forma similar,

un elemento regulador y un promotor principal están unidos operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor principal.

Pueden producirse anticuerpos usando métodos y composiciones recombinantes, p.ej., tal como se escribe en la patente de EE.UU. n.º 4.816.567. En una realización, se proporciona el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de polipéptido de fusión descrito en el presente documento. En una realización, se proporcionan uno o más vectores (p. ej., vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula anfitriona que comprende dicho ácido nucleico. En una dicha realización, una célula anfitriona comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un primer polipéptido de fusión y una secuencia de aminoácidos que comprende un segundo polipéptido de fusión, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un primer polipéptido de fusión y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un segundo polipéptido de fusión. En una realización, la célula anfitriona es eucariota, p.ej., una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (p. ej., célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para fabricar un polipéptido de fusión, en el que el método comprende cultivar una célula anfitriona que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión, tal como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión y, opcionalmente, recuperar la proteína de fusión de la célula anfitriona (o del medio de cultivo de la célula anfitriona).

Para producción recombinante de un polipéptido dimérico tal como se publica en el presente documento, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, p.ej., tal como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para clonación y/o expresión posterior en una célula anfitriona. Dicho ácido nucleico puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican el polipéptido de fusión).

Las células anfitrionas adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican polipéptidos de fusión incluyen las células procariotas o eucariotas que se describen en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido de fusión puede producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, p.ej., los documentos US 5.648.237, US 5.789.199; y US 5.840.523 (véase también Charlton, K.A., en: Methods in Molecular Biology, vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), págs. 245-254, que describen la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el polipéptido puede aislarse a partir de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras son anfitriones de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos de fusión, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado" resultando en la producción de un polipéptido de fusión con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano (véanse Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215).

Las células anfitrionas adecuadas para la expresión de polipéptidos de fusión glucosilados también proceden de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden utilizar junto con células de insecto, especialmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como anfitriones (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. n.º. 5.959.177, 6.040.498 6.420.548 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también pueden usarse como anfitrionas. Por ejemplo, pueden ser útiles células de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono trasformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, p.ej., en Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 tal como se describe, p.ej., en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, p.ej., en Mather, J.P., et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR-CHO (Urlaub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares anfitrionas de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véanse, p.ej., Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), págs. 255-268.

Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los polipéptidos de fusión proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de moléculas que contienen una región Fc en una muestra biológica. El término “detectar” tal como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa.

En una realización, se proporciona un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de moléculas que contienen una región Fc en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del polipéptido de fusión a una molécula que contiene una región Fc y detectar si se forma un complejo entre el polipéptido de fusión y una molécula que contiene una región Fc. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.

En ciertas realizaciones, se proporcionan polipéptidos de fusión marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, densos a electrones, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p.ej., mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, e ^{131}I, fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, p.ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente EE.UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, p.ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófago, radicales libres estables, y similares.

Composiciones Farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un polipéptido de fusión tal como se publica en el presente documento se preparan mezclando dicho polipéptido dimérico que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecil dimetilbencil cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de alrededor de 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como poli(vinilpirrolidona); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo en el presente documento incluyen adicionalmente agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas hialuronidasa activas-neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). En las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 2005/0260186 y 2006/0104968 se describen ciertas sHASEGP de ejemplo y sus métodos de uso, incluyendo rhuPH20. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas tales como condroitinasas.

En la patente de EE.UU. n.º 6.267.958 se describen formulaciones de anticuerpo de ejemplo. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las que se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.171.586 y en el documento WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación del presente documento puede contener también más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichos principios activos están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metil metacrilato), respectivamente, en sistemas de dispensación farmacológica coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido de fusión, matrices que están en forma de artículos conformados, p. ej., películas, o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son, generalmente, estériles. Puede lograrse fácilmente la esterilidad, p. ej., mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Métodos y composiciones terapéuticos

Cualquiera de los polipéptidos de fusión tal como se publican en el presente documento puede usarse en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido de fusión para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un polipéptido de fusión para su uso para tratar una enfermedad caracterizada por niveles de anticuerpos elevados. En una realización la enfermedad es una enfermedad autoinmune. En ciertas realizaciones, se proporciona un polipéptido de fusión para su uso en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido de fusión para su uso en un método de tratar a un individuo que tiene una enfermedad caracterizada por niveles de anticuerpos elevados, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del polipéptido de fusión. En una dicha realización, el método comprende adicionalmente administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un polipéptido de fusión para su uso para reducir los niveles de anticuerpos. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido de fusión para su uso en un método de reducir los niveles de anticuerpos de un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del polipéptido de fusión para reducir los niveles de anticuerpos. Un "individuo" de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores es preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un polipéptido de fusión en la fabricación o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por niveles de anticuerpos elevados. En una realización la enfermedad es una enfermedad autoinmune. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método de tratar niveles de anticuerpos elevados comprende administrar a un individuo que tiene una enfermedad caracterizada por niveles de anticuerpos elevados una cantidad eficaz del medicamento. En una dicha realización, el método comprende adicionalmente administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En una realización adicional, el medicamento es para reducir los niveles de anticuerpos. En una realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para reducir los niveles de anticuerpos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para reducir el nivel de anticuerpos. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad caracterizada por niveles de anticuerpos elevados. En una realización la enfermedad es una enfermedad autoinmune. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene dicha enfermedad caracterizada por niveles de anticuerpos elevados una cantidad eficaz de un polipéptido de fusión. En una dicha realización, el método comprende adicionalmente administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para reducir los niveles de anticuerpos en un individuo. En una realización, el método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido de fusión para reducir los niveles de anticuerpos. En una realización, un "individuo" es un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los polipéptidos de fusión tal como se publican en el presente documento, p.ej., para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los polipéptidos de fusión tal como se publican en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los polipéptidos de fusión tal como se publican en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional.

Los polipéptidos de fusión de la invención pueden usarse, bien solos o bien en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un polipéptido de fusión de la invención puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional.

Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y administrarse por separado, en cuyo caso, la administración del polipéptido de fusión de la invención puede tener lugar antes de, de manera simultánea, y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional.

Un polipéptido de fusión de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, por vía intrapulmonar e intranasal, y, si se desea

para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, p. ej., mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación, incluyendo pero sin limitarse a administraciones individuales o múltiples a lo largo de diversos momentos, administración en bolo y la infusión por pulsos.

[0162] Los polipéptidos de fusión de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una forma coherente con la buena práctica médica. Los factores para considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de dispensación del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios. El polipéptido de fusión no se formula necesariamente, sino opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de polipéptido de fusión presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores discutidos anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración tal como se describen en el presente documento, o a alrededor de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que es apropiada.

[0163] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un polipéptido de fusión de la invención (cuando se use solo o en combinación con uno más otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de polipéptido de fusión, de la gravedad y evolución de la enfermedad, independientemente de si el polipéptido de fusión se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, del historial clínico del paciente y de la respuesta al polipéptido de fusión y del criterio del médico tratante. El polipéptido de fusión se administra de manera adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial para la administración al paciente puede ser de alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (p. ej., 0,5 mg/kg-10 mg/kg) de polipéptido de fusión, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar desde alrededor de 1 µg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría generalmente hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación de ejemplo del polipéptido de fusión estaría en el intervalo de alrededor de 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, p. ej., cada semana o cada tres semanas (p. ej., de forma que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte, o, p. ej., alrededor de seis dosis del polipéptido de fusión). Puede administrarse una dosis inicial de carga mayor, seguida por una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores puede llevarse a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de un polipéptido de fusión.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto en o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un polipéptido de fusión de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un polipéptido de fusión de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un agente citotóxico o terapéutico de otro modo, adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un polipéptido de fusión.

Los siguientes ejemplos, figuras y secuencias proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de los plásmidos de expresión

a) Generación del plásmido de expresión para un polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G

El gen codificador del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G se ensambló fusionando fragmentos de ADN sintetizados químicamente que codificaban i) una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina (MGWSCIILFLVATATGVHS: SEQ ID NO: 55), ii) un receptor RFc gamma IIIa V158 humano de los restos de aminoácidos 2-193 (es decir, excluyendo la metionina de iniciación), y iii) una región constante de cadena pesada de Fc gamma-1 humana (bisagra CH2-CH3) con las mutaciones L234A, L235A y P329G.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria de un polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G en células HEK293 comprendió, además del casete de expresión del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G, un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* un gen de beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*, En detalle, la unidad de transcripción del gen codificador del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador y promotor tempranos inmediatos del citomegalovirus humano (P-CMV) incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida (5'UTR) de cadena pesada de inmunoglobulina humana,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un polipéptido de receptor Fc gamma III V158 humano soluble de la posición de aminoácidos 2-193 de la proteína del receptor Fc gamma III V158 humana natural,
- una región constante de cadena pesada de Fc gamma 1 humano (bisagra-CH2-CH3, LALA P329G), y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (secuencia señal HCB poli A).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G maduro es:

GMRTEDLPKA VVFLEPQWYR VLEKDSVTLK CQGAYSPEDN STQWFHNESL
ISSQASSYFI DAATVDDSGE YRCQTNLSTL SDPVQLEVHI GWLLLQAPRW
VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK GRKYFHHNSD FYIPKATLKD
SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFFPPG YQGLNDIFEA
QKIEWHELVV APPAPEDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 56).

Los siguientes polipéptidos de fusión pueden obtenerse de forma análoga:

- Polipéptido de fusión RFcgammaIIa-LR(H131)-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G:

QAAAPPKAVL KLEPPWINVL QEDSVTLTCQ GARSPESDSI QWFHNGNLIP
THTQPSYRFK ANNNDSGEYT CQTGQTSLSD PVHLTVLSEW LVLQTPHLEF
QEGETIMLRC HSWKDKPLVK VTFFQNGKSQ KFSHLDPTFS IPQANHSHSG
DYHCTGNIGY TLFSSKPVTI TVQVPSMGSS SPMGIGLNDI FEAQKIEWHE
LVVAPPAPED KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKC KVSNKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT
VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

(SEQ ID NO: 57).

- Polipéptido de fusión RFcgammaIIb-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G:

APPKAVLKLE PQWINVLQED SVTLTCRGTH SPESDSIQWF HNGNLIPTHT
QPSYRFKANN NDSGEYTCQT GQTSLSDPVH LTVLSEWLVL QTPHLEFQEG
ETIVLRCHSW KDKPLVKVTF FQNGKSKKFS RSDPNFSIPQ ANHSHSGDYH
CTGNIGYTLY SSKPVTITVQ APGLNDIFEA QKIEWHELVV APPAPEDKTH
TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP

SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 58).

- Polipéptido de fusión RFcgammaIIIb-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G:

GMRTEDLPKA VVFLEPQWYS VLEKDSVTLK CQGAYSPEDN STQWFHNESL
ISSQASSYFI DAATVNDSGE YRCQTNLSTL SDPVQLEVHI GWLLLQAPRW
VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK DRKYFHHNSD FHIPKATLKD
SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFSPPG YQGLNDIFEA
QKIEWHELVV APPAPEDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 59).

- Polipéptido de fusión FcgammaRIIIa-Avi-Fc LALA p239G mínimo (sin sitio de escisión de proteasa):

GWLLLQAPRW VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK GRKYFHHNSD
FYIPKATLKD SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFFPPG
YQGLNDIFEA QKIEWHELED KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD
GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

(SEQ ID NO: 60).

c) Generación de los plásmidos de expresión de "pomo en agujero" para polipéptido de fusión de receptor Fc dimérico

El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión receptor Fc-región Fc (agujero) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente en el artículo a). Se diferenció de ahí en la secuencia de ADN que codifica la región Fc con las mutaciones de agujero T366S, L368A, Y407V e Y349C dentro de la región constante de cadena pesada gamma- 1 humana.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión receptor Fc-región Fc (pomo) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente en el artículo a). Se diferenció de ahí en la secuencia de ADN que codifica la región Fc con las mutaciones de pomo T366W y S354C dentro de la región constante de cadena pesada gamma-1 humana.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión receptor Fc-región Fc (pomo/agujero) en HEK293 comprendió además del casete de expresión (pomo/agujero) del polipéptido de fusión, un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen que codifica el polipéptido de fusión (pomo/agujero) comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador y promotor tempranos inmediatos del citomegalovirus humano (P-CMV) incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida (5'UTR) de cadena pesada de inmunoglobulina humana,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- una región constante de cadena pesada de Fc-gamma-1- (bisagra-CH2-CH3) con las mutaciones de agujero T366S, L368A, Y407V e Y349C o las mutaciones de pomo T366W y S354C dentro de la región constante de cadena pesada gamma-1 humana y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (secuencia señal HCB poli A).

Ejemplo 2

Expresión transitoria, purificación y caracterización analítica del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G

Los polipéptidos de fusión se obtuvieron mediante transfección transitoria de células HEK293 (procedentes de la línea celular 293 de riñón embrionario humano) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección "sin 293", se usó reactivo de transfección Transfection Reagent (Novagen). Los pares del polipéptido de fusión de pomo en agujero se expresaron a partir de dos plásmidos diferentes usando una proporción equimolar de plásmido en la transfección. Las transfecciones se llevaron a cabo tal como se especifica en las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de cultivo que contenían el polipéptido de fusión se recogieron siete días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura reducida hasta su purificación.

La información general referente a la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas p. ej., en células HEK293 se da en: Meissner, P., et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

Los sobrenadantes de cultivo que contenían el polipéptido de fusión se filtraron y purificaron mediante dos etapas cromatográficas. Los polipéptidos de fusión se capturaron mediante cromatografía de afinidad usando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrado con PBS (KH_2PO_2 1 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM), pH 7,4. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante lavado con tampón de equilibrado y el polipéptido de fusión se recuperó con tampón citrato 0,05 mM, pH 3, inmediatamente después de la elución se neutralizó a pH 6,5 con Tris-base 1 M, pH 9,0. Se usó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como

segunda etapa de purificación. La cromatografía de exclusión por tamaño realizó en tampón MOPS 2 mM, NaCl 0,125 M, pH 7,2. Los polipéptidos de fusión eluidos se concentraron con una unidad de filtro de centrifugación Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se almacenaron a -80 °C.

Se purificaron cuatro polipéptidos de fusión RFcgammaIIIa-Fc diferentes de acuerdo con este protocolo:

a) RFcgammaIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G (sin sitio de escisión)
b) RFcgammaIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G mínimo (sin sitio de escisión)
c) RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa PreScission (PP)-Fc LALA P239G
d) RFcgammaIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G

Se determinaron las concentraciones de proteína de los polipéptidos de fusión midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. La pureza y la correcta formación de dímero de los polipéptidos de fusión se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-dithiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. El contenido agregado de las preparaciones de polipéptido de fusión se determinó mediante CET de alta resolución usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 200™ (GE Healthcare). La integridad de la cadena principal del polipéptido de fusión reducido se verificó mediante espectrometría de masas por nanoelectronebulización después de la eliminación de N-glucanos mediante tratamiento enzimático con una combinación de neuraminidasa, O-glucanasa y péptido-N-glucosilasa F (Roche Applied Science).

Ejemplo 3

Escisión por papaína

Los polipéptidos de fusión FcgammaRIIIa-Fc que no comprenden un sitio de escisión enzimática pueden escindirse por papaína. El polipéptido de fusión FcgammaRIIIa-Fc fusión se escindió añadiendo cisteína y 0,1 mU/mg de polipéptido de fusión de papaína (de *Carica papaya*, Roche Diagnostics GmbH) a 37 °C durante 1 h. La purificación posterior se efectuó tal como se describe en el ejemplo 2. En la figura 2 se muestra un gel SDS-PAGE analítico.

Ejemplo 4

Escisión por proteasa Ides

La escisión del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G con proteasa Ides es muy ineficaz y, por lo tanto, en este caso no es útil.

Ejemplo 5

Escisión por proteasa PreScission

Después de diálisis contra Tris50 mM, NaCl 150, EDTA 1 mM, DTT 1 mM pH 7,4, el polipéptido de fusión RFcgammaIIIa-(PP)-Fc se escindió añadiendo entre 1-15 U de proteasa PreScission (GE Healthcare)/100 µg de polipéptido de fusión a temperatura ambiente durante toda la noche. Solo pudo escindirse parte de la proteína. Por otra parte, se observó escisión inespecífica por la proteasa PreScission del receptor sin sitio de escisión de PP.

Ejemplo 6

Escisión por proteasa IgA

Tras diálisis contra Tris 50 mM pH 8 usando un casete "Slide-a-lyzer" el polipéptido de fusión RFcgammaIIIa-Fc se escindió añadiendo proteasa IgA (Roche Diagnostics GmbH) a una proporción de p(proteasa)/p(polipéptido de fusión) de 1:100 a 21 °C durante toda la noche. La escisión se controló mediante cromatografía de exclusión por tamaño (CET) analítica, (Superdex 75; GE Healthcare). Después de la escisión, el receptor RFcgammaIIIa se separó de la proteasa IgA mediante cromatografía de exclusión por tamaño preparatoria en Superdex 75™ (GE Healthcare) y del marcador Fc mediante columna HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare). En la figura 3 se muestra un gel SDS-PAGE analítico.

Tabla: Rendimiento de la fermentación y purificación de diferentes polipéptidos de fusión que comprenden RFcgammaIIIa V158.

Polipéptido de fusión	Peso molecular [kDa]	Rendimiento después de la captura [mg/l de sobrenadante]	Contenido de monómero (CET) [%]	Rendimiento después de la CET [mg/l de sobrenadante]	Rendimiento después de la escisión y purificación adicional [mg/l de sobrenadante]
RFcgammaIIIa V158-HisAvi (201)	25,4	3,5	70	1,4	-
RFcgammaIIIa V158-Avi-Fc LALA P329G (0.51)	39	14	70	3 (no activo)	
RFcgammaIIIaV158-Avi-Fc LALA P329G (0.51)	49	80	95	78	21 (sin marcador Avi)
RFcgammaIIIa V158-Avi-PP-Fc LALA P329G (0.51)	50	24	50	No determinado	No determinado
RFcgammaIIIa V158-Avi-PIgA-Fc LALA P329G (9.21)	50	46	90	36	16 (con marcador Avi)

Ejemplo 7

Preparación de la columna de afinidad de RFcgammaIIIaV158

[0184] Se preparó una columna de afinidad con RFcgammaIIIaV158 mediante biotinilación *in vitro* con el marcador Avi y acoplamiento posterior a estreptavidina sefaarosa. Esto puede hacerse con el polipéptido de fusión intacto así como con el receptor después de haber escindido la región Fc. Es un método muy rápido y eficaz para preparar una columna de afinidad con fines analíticos y preparatorios.

Biotinilación del receptor

[0185] Se biotiniló un dominio extracelular soluble de RFcgammaIIIaV158 con Avi Tag expresado en células HEK293 después de su purificación de acuerdo con el siguiente protocolo: Se biotinilaron entre 1,2 y 12 mg de RFcgammaIIIaV158 o entre 2,4 y 24 mg de polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158 región Fc marcado en MOPS 2 mM, NaCl 125 mM pH 7,2, Tween 0,02 %, y 1 comprimido de inhibidor de proteasa completo (Roche) en 3 ml de PBS usando el kit de biotinilación de Avidity de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de biotinilación se efectuó a temperatura ambiente durante toda la noche. El polipéptido modificado se dializó contra tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM pH 7.5 a 4°C durante toda la noche para eliminar el exceso de biotina.

Acoplamiento a estreptavidina sefarosa

Se añadió 1 g de estreptavidina sefarosa (GE Healthcare) al receptor biotinilado y dializado, se incubó durante 2 horas con agitación y, finalmente, se rellenó en una columna XK de 1 ml (GE Healthcare).

Ejemplo 8

Métodos cromatográficos

	Condiciones generales:
Tampón de equilibrado A:	Ácido cítrico 20 mM/NaCl 150 mM pH 6,0
Tampón de elución B:	Ácido cítrico 20 mM/NaCl 150 mM pH 3,0
Elución:	5 min A al 100 % en 60 min en B hasta el 100 %, 0,1 min B al 100 %, 6 min A al 100%,
Cantidad de muestra:	50 µg o más

Separación de anticuerpos fucosilados y afucosilados

La cromatografía de anticuerpos en columna de RFcγIIIa permito cuantificar la fracción del anticuerpo completamente fucosilado y fucosilado. La fracción afucosilada del anticuerpo se correlaciona con ADCC de la preparación de anticuerpo.

En la figura 4, se muestra la separación y cuantificación de diferentes formas de glucosilación de un anticuerpo anti-Her (natural, en la parte superior) y un anticuerpo anti-Her modificado por glucoingeniería en una columna de Fc-RFcγIIIa. El tiempo del análisis pudo acortarse modificando el gradiente, mientras que se mantenía la resolución.

Comparación de cromatografía de afinidad usando RFcgammaIIIaV158 y RFcgammaIIIaV158 marcado con Fc

Después de acoplar ambas construcciones de receptor en cantidades equimolares, las columnas de afinidad se comportan de forma equivalente al separar anticuerpos completamente fucosilados y afucosilados (figura 5: negro: RFcgammaIIIaV158; azul: RFcgammaIIIaV158-Fc).

Ejemplo 9

Determinación de la interacción RFcγIIIaV158-Avi-Proteasa IgA -Fc LALA P329G - IgG

El sistema BIAcore® está bien establecido para el estudio de interacciones moleculares. Permite un control continuo en tiempo real de las uniones de ligando/analito y, por tanto, la determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_a), constantes de velocidad de disociación (k_d) y constantes de equilibrio (K_D). Los cambios en el índice de refracción indican cambios de masa sobre la superficie causados por la interacción del ligando inmovilizado con el analito en solución inyectado. Si las moléculas se unen a ligandos inmovilizados sobre la superficie la masa aumenta, en el caso de disociación, la masa disminuye.

Para la determinación de la actividad del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Fc LALA P329G se usó un ensayo de unión directa.

Se acoplaron alrededor de 400 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (20 µg/ml Human Fab Capture Kit GE Healthcare, 28-9583-25) sobre una microplaca CM5 (GE Healthcare BR1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE. La muestra y el sistema de tampón fue HBS-P+ pH 7.4 (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % (v/v)). La celda de flujo se ajustó a 25 °C y el bloque de muestra a 12 °C. Se capturó un anticuerpo inyectando una solución 50 nM durante 360 seg a un flujo de 10 µl/min. La unión se determinó mediante inyección de polipéptido de fusión RFcgammaIIIa 50 nM durante180 seg a un flujo de 50 µl/min para la asociación y 360 seg para la disociación. La superficie se regeneró mediante lavado de 60 seg con solución de glicina pH 2,1 a un caudal de 20 µl/min. Para la evaluación de la actividad de las construcciones se han comparado las alturas de la señal y el comportamiento de disociación.

Tal como se muestra en la figura 6, la respuesta del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Fc LALA P329G presenta más de 100 unidades de respuesta en comparación con el RFcgammaIIIaV158 con 40 UR.

Ejemplo 10

Determinación de la interacción cinética de IgG del polipéptido de fusión RFcγIIIaV158-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P329G antes y después de la escisión

Para la determinación de la actividad del polipéptido de fusión RFcgammaIIIaV158-Fc LALA P329G escindido se usó un ensayo de unión directa.

Se acoplaron alrededor de 400 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (20 µg/ml, Human Fab Capture Kit GE Healthcare, 28-9583-25) sobre una microplaca CM5 (GE Healthcare BR1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE. La muestra y el sistema de tampón fue HBS-P+ pH 7,4 (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v). La celda de flujo se ajustó a 25 °C y el bloque de muestra a 1,2 °C. Se capturó un anticuerpo inyectando una solución 50 nM durante 80 seg a un flujo de 10 µl/min.

Se hicieron pasar a través de las celdas de flujo diferentes concentraciones de anticuerpos que oscilaron de 0 a 250 nM (diluciones 1:2) con un caudal de 30 µl/min para determinar la asociación a 25 °C durante 120 seg. La fase de disociación se controló durante 420 seg cambiando de la solución de muestra al tampón de ejecución. La superficie se regeneró mediante lavado de 60 seg con solución de glicina pH 2,1 a un caudal de 20 µl/min.

Las diferencias del índice de refracción global se corrigieron restando la respuesta obtenida de una superficie sin RFcγIIaV158 capturado. También se restan las inyecciones de tampón de blanco (= doble referencia).

La constante de disociación de equilibrio (K_D), definida como k_a/k_d, se determinó analizando las curvas del sensograma obtenidas con varias concentraciones diferentes, usando el paquete informático BIAevaluation. El ajuste de los datos siguió un modelo de unión adecuado. En la figura 7 se muestran los sensogramas del polipéptido de fusión receptor Fcgamma V158-Fc LALA P329G (figura 7a), receptor Fcgamma V158 (figura 7b), polipéptido de fusión receptor Fcgamma V158-Fc LALA P329G escindido (figura 7c).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Método para producir RFc soluble como fusión de Fc con la región Fc de inmunoglobulina inerte y usos de los mismos

<130> 31131 WO

<150> EP12179025
<151> 2012-08-02

<160> 60

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ala	**Pro**	**Glu**	**Leu**	**Leu**	**Gly**	**Gly**	**Pro**	**Ser**	**Val**	**Phe**	**Leu**	**Phe**	**Pro**	**Pro**	**Lys**
1				**5**					**10**					**15**	
Pro	**Lys**	**Asp**	**Thr**	**Leu**	**Met**	**Ile**	**Ser**	**Arg**	**Thr**	**Pro**	**Glu**	**Val**	**Thr**	**Cys**	**Val**
			20					**25**					**30**		
Trp	**Asp**	**Val**	**Ser**	**His**	**Glu**	**Asp**	**Pro**	**Glu**	**Val**	**Lys**	**Phe**	**Asn**	**Trp**	**Tyr**	**Val**
		35					**40**					**45**			
Asp	**Gly**	**Val**	**Glu**	**Val**	**His**	**Asn**	**Ala**	**Lys**	**Thr**	**Lys**	**Pro**	**Arg**	**Glu**	**Glu**	**Gln**
	50					**55**					**60**				
Glu	**Ser**	**Thr**	**Tyr**	**Arg**	**Trp**	**Ser**	**Val**	**Leu**	**Thr**	**Val**	**Leu**	**His**	**Gln**	**Asp**	**Trp**
65					**70**					**75**					**80**
Leu	**Asn**	**Gly**	**Lys**	**Glu**	**Tyr**	**Lys**	**Cys**	**Lys**	**Val**	**Ser**	**Asn**	**Lys**	**Ala**	**Leu**	**Pro**
				85					**90**					**95**	
Ala	**Pro**	**Ile**	**Glu**	**Lys**	**Thr**	**Ile**	**Ser**	**Lys**	**Ala**	**Lys**					
			100					**105**							

<210> 2
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1               5                  10                  15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

            20                  25                  30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
        35                  40                  45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
    50                  55                  60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65                  70                  75                  80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                85                  90                  95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            100                 105
```

<210> 3
<211> 227
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 4
<211> 227
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A

<400> 4

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
```

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 5
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación de agujero
<400> 5

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 6
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación de pomo

<400> 6

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 7
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación con una L234A, L235A y de agujero

<400> 7

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
1				5					10					15	

```
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 8
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una L234A, L235A y de pomo

<400> 8

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 9
<211> 227

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación P329G

<400> 9

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205
```

```
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 10
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación 1,234A, L235A y P329G

<400> 10

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1               5                   10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175
```

```
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 11
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una P239G y de agujero

<400> 11

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                   10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140
```

```
Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 12
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación P329G y de pomo

<400> 12

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                   10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
            100                 105                 110
```

```
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 13
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y de agujero

<400> 13

```
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1               5                   10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80
```

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 14
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y de pomo

<400> 14

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

```
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 15
<211> 229
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                   10                  15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30
```

```
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225
```

<210> 16
<211> 229
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG4 con una mutación S228P y L235E

<400> 16

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                  10                  15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225
```

<210> 17
<211> 229
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región Fc humana variante del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E y P329G

<400> 17

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1               5                  10                  15

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        35                  40                  45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    50                  55                  60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                85                  90                  95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Gly Ser
            100                 105                 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        115                 120                 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    130                 135                 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145                 150                 155                 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                165                 170                 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
            180                 185                 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        195                 200                 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    210                 215                 220

                    Leu Ser Leu Gly Lys
                    225
```

<210> 18
<211> 191
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

```
Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln
1               5                  10                  15

Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly
            20                  25                  30

Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser
        35                  40                  45

Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val
    50                  55                  60

Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser
65                  70                  75                  80

Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala
                85                  90                  95

Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His
            100                 105                 110

Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly
        115                 120                 125

Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys
    130                 135                 140

Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly
145                 150                 155                 160

Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly
                165                 170                 175

Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
            180                 185                 190
```

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador Arg

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador Arg 2

<400> 20

Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador Avi

<400> 21

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador His-Avi

<400> 22

His His His His His His Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
1 5 10 15

Ile Glu Trp His Glu
20

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador His

<400> 23

His His His His His His
1 5

<210> 24
<211> 19

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 24

Lys Asp His Leu Ile His Asn Val His Lys Glu Phe His Ala His Ala
1 5 10 15

His Asn Lys

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 25

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 26

Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
1 5 10 15

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
20

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido#

<400> 27

Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Marcador de aminoácido

<400> 28

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 29

Met Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg
1 5 10

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 30

Met Asp Val Glu Ala Trp Leu Gly Ala Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
1 5 10 15

<210> 31
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 31

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro
35

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 32

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 33

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser
1 5 10 15

<210> 34
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 34

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg
1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu
20 25

<210> 35
<211> 47
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marcador de aminoácido

<400> 35

Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
1 5 10 15

Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser
20 25 30

Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
35 40 45

<210> 36
<211> 32
<212> PRT

<213> *Butyrivibrio fibrisolvens*

<400> 36

```
Met Asp Trp Asn Ala Asn Ile Ala Pro Gly Asn Ser Val Glu Phe Gly
1               5                  10                  15

Ile Gln Gly Ala Gly Ser Val Gly Asn Val Ile Asp Ile Thr Val Glu
            20                  25                  30
```

<210> 37
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio de unión a quitina

<400> 37

```
Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala
1               5                  10                  15

Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro
            20                  25                  30

His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp
        35                  40                  45

Gln Leu Gln
    50
```

<210> 38
<211> 209
<212> PRT
<213> *Chondrus crispus*

<400> 38

```
Met Pro Glu Ile Lys Leu Thr Tyr Phe Asp Met Arg Gly Arg Ala Glu
1               5                  10                  15

Ala Ser Arg Leu Ala Leu Val Val Gly Glu Ile Pro Phe Glu Asp Glu
            20                  25                  30

Arg Val Val Phe Asp His Trp Lys Glu Ala Lys Pro Lys Thr Pro Tyr
        35                  40                  45

Ala Ala Leu Pro Met Leu Thr Val Asp Gly Met Gln Val Ala Gln Ser
    50                  55                  60

Asp Ala Ile Leu Arg Tyr Cys Gly Lys Leu Ala Gly Leu Tyr Pro Ser
65                  70                  75                  80

Asp Pro Leu Glu Ala Ala Lys Val Asp Glu Val Gly Gly Val Ile Asp
                85                  90                  95

Asp Val Thr His Ala Met Tyr Arg Tyr Arg Gly Asp Asp Lys Asp Lys
            100                 105                 110

Leu Arg Glu Glu Arg Asp Lys Phe Ser Lys Val Asp Val Pro Arg Tyr
        115                 120                 125

Val Gly Ala Leu Glu Lys Arg Leu Glu Ala Phe Gly Asp Gly Pro Trp
    130                 135                 140

Ala Val Gly Gly Asn Met Thr Ile Ala Asp Leu His Ile Cys His Leu
145                 150                 155                 160

Val Thr Asn Ile Arg Cys Gly Met Leu Asp Phe Val Asp Lys Asp Leu
                165                 170                 175

Leu Glu Gly Tyr Val Arg Ile Val Lys Ser Tyr Ser Ala Val Met Glu
            180                 185                 190

His Pro Lys Val Thr Glu Trp Tyr Glu Lys Lys Pro Val Lys Met Phe
        195                 200                 205

Ser
```

<210> 39
<211> 396
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 39

Met Lys Ile Lys Thr Gly Ala Arg Ile Leu Ala Leu Ser Ala Leu Thr
1 5 10 15

Thr Met Met Phe Ser Ala Ser Ala Leu Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys
20 25 30

Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu
35 40 45

Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu
50 55 60

His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly
65 70 75 80

Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr
85 90 95

Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln
100 105 110

Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys
115 120 125

Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn
130 135 140

Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala
145 150 155 160

Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn
165 170 175

Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly
180 185 190

Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly
195 200 205

Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu
210 215 220

Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu
225 230 235 240

Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp
245 250 255

```
Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val
            260                 265                 270

Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu
        275                 280                 285

Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu
    290                 295                 300

Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn
305                 310                 315                 320

Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu
                325                 330                 335

Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys
            340                 345                 350

Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala
        355                 360                 365

Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp
    370                 375                 380

Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Arg Ile Thr Lys
385                 390                 395
```

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 40

```
Pro Ala Pro Ser Pro
1               5
```

<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 41

Pro Pro Ser Pro

1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 42

Pro Pro Ala Pro
1

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 43

Pro Pro Thr Pro
1

<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 44

Pro Pro Gly Pro
1

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 45

Pro Arg Pro Pro Thr Pro
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 46

Val Val Ala Pro Pro Ala Pro
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 47

Val Val Ala Pro Pro Ser Pro
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 48

Val Val Ala Pro Pro Thr Pro
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 49

Val Val Ala Pro Pro Gly Pro
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 50

Pro Arg Pro Pro Thr Pro
1 5

<210> 51

<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 51

Ala Pro Pro Ala Ala Pro
1 5

<210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 52

Pro Arg Pro Pro Ala Pro
1 5

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 53

Pro Arg Pro Pro Ser Pro
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sitio de escisión enzimática

<400> 54

Pro Arg Pro Pro Gly Pro
1 5

<210> 55
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 55

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 56
<211> 443
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión RFcyIIIaV158-Avi-Proteasa IgA -Fc LALA P239G maduro

<400> 56

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1 5 10 15

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
50 55 60

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
85 90 95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
130 135 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
145 150 155 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln

165 170 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
180 185 190

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Leu
195 200 205

Val Val Ala Pro Pro Ala Pro Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

```
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
            420                 425                 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 57
<211> 436
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión RFcyIIa-LR(H131)-Avi-Proteasa IgA Proteasa-Fc LALA P239G

<400> 57

```
Gln Ala Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp
1               5                   10                  15

Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala
            20                  25                  30

Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
        35                  40                  45

Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
    50                  55                  60

Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
65                  70                  75                  80

Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
                85                  90                  95

His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
            100                 105                 110

Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys
        115                 120                 125

Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala
    130                 135                 140

Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr
145                 150                 155                 160

Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser
                165                 170                 175
```

```
Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
            180                 185                 190

Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Leu Val Val Ala Pro Pro Ala Pro
        195                 200                 205

Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
    210                 215                 220

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
225                 230                 235                 240

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
                245                 250                 255

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
            260                 265                 270

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
        275                 280                 285

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
    290                 295                 300

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
305                 310                 315                 320

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
                325                 330                 335

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
            340                 345                 350

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
        355                 360                 365

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
    370                 375                 380

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
385                 390                 395                 400

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
                405                 410                 415

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
            420                 425                 430
```

Ser Pro Gly Lys
435

<210> 58
<211> 423
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión RFcyIIb-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G

<400> 58

Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val
1 5 10 15

Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro
20 25 30

Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr
35 40 45

His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly
50 55 60

Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu
85 90 95

Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp
100 105 110

Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys
115 120 125

Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser
130 135 140

His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Gly Leu Asn Asp
165 170 175

Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Leu Val Val Ala Pro
180 185 190

```
Pro Ala Pro Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        195                 200                 205

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    210                 215                 220

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
225                 230                 235                 240

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                245                 250                 255

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            260                 265                 270

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        275                 280                 285

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    290                 295                 300

Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
305                 310                 315                 320

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
                325                 330                 335

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            340                 345                 350

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    370                 375                 380

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
385                 390                 395                 400

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                405                 410                 415

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            420
```

<210> 59
<211> 443
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión RFcyIIIb-Avi-Proteasa IgA-Fc LALA P239G

<400> 59

```
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
1               5                  10                  15

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
            20                  25                  30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
        35                  40                  45

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
    50                  55                  60

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
65                  70                  75                  80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
                85                  90                  95

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
            100                 105                 110

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
        115                 120                 125

Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
    130                 135                 140

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
145                 150                 155                 160

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
                165                 170                 175

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
            180                 185                 190

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Leu
        195                 200                 205

Val Val Ala Pro Pro Ala Pro Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
    210                 215                 220
```

```
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225                 230                 235                 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
                245                 250                 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
            260                 265                 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
        275                 280                 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
    290                 295                 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305                 310                 315                 320

Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
                325                 330                 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
            340                 345                 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
        355                 360                 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
    370                 375                 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385                 390                 395                 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                405                 410                 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
            420                 425                 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 60
<211> 346
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido de fusión RFcyIIIa-Avi-Fc LALA p239G mínimo
<400> 60

```
Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp
1               5                  10                  15

Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys
            20                  25                  30

Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn
        35                  40                  45

Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr
    50                  55                  60

Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val
65                  70                  75                  80

Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe
                85                  90                  95

Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
            100                 105                 110

Ile Glu Trp His Glu Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
        115                 120                 125

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
145                 150                 155                 160

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
                165                 170                 175

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
            180                 185                 190

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
        195                 200                 205

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
    210                 215                 220

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
225                 230                 235                 240
```

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
245 250 255

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
260 265 270

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
275 280 285

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
290 295 300

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
305 310 315 320

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
325 330 335

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I

R1-FC-R2 (fórmula I)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,
R2 indica un segundo receptor Fc, y
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,

en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que FC no se une sustancialmente a R1 y/o R2,
en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente entre sí de entre el grupo de receptor Fcgamma humano, receptor Fc neonatal humano, receptor Fc murino y receptor Fc neonatal de conejo, y
en la que FC es polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G.

2. El polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el polipéptido de fusión tiene la fórmula II

R1-SE1-L1-SE2-FC-SE3-L2-SE4-R2 (fórmula II)

en la que

R1 indica un primer receptor Fc,
R2 indica un segundo receptor Fc,
FC indica un polipéptido de región Fc de cadena pesada,
SE1 indica un primer sitio de escisión,
SE2 indica un segundo sitio de escisión,
SE3 indica un tercer sitio de escisión,
SE4 indica un cuarto sitio de escisión,
L1 indica un primer engarzador y
L2 indica un segundo engarzador,

en la que están presentes R1 o R2 o ambos,
en la que uno cualquiera de SE1, SE2, SE3, SE4 pueden estar presentes o ausentes independientemente entre sí,
en la que L1 y L2 pueden estar presentes o ausentes independientemente entre sí, en la que FC no se une sustancialmente a R1 y/o R2,
en la que R1 y R2 se seleccionan independientemente entre sí de entre el grupo de receptor Fcgamma humano, receptor Fc neonatal humano, receptor Fc murino y receptor Fc neonatal de conejo, y
en la que FC es polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G.

3. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que el receptor Fcgamma humano se selecciona de entre RFcγI humano, RFcγII humano, RFcγIIA humano, RFcγIIB humano, RFcγIIC humano, RFcγIII humano, RFcγIIIA humano y RFcγIIIB humano.

4. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el receptor Fcgamma humano se selecciona de entre RFcγIA humano, RFcγIB humano, RFcγIC humano, RFcγIIA humano, alotipo H131 de RFcγIIA humano, alotipo R131 de RFcγIIA humano, RFcγIIB humano, RFcγIIB-1 humano, RFcγIIB-2 humano, RFcγIIc humano, RFcγIIIA humano, alotipo V158 de RFcγIIIA humano, alotipo F158 de RFcγIIIA humano, RFcγIIIb humano, alotipo RFcγIIB-NA1 de RFcγIIIb humano, alotipo RFcγIIB-NA2 de RFcγIIIb humano, isoformas de RFcγ humano.

5. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizado por que el receptor Fcgamma humano es RFcgammaIIIaV158.

6. Un polipéptido de fusión dimérico que comprende dos polipéptidos de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. El polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que el primer FC comprende la mutación T366W y opcionalmente la mutación S354C y el segundo FC comprende las mutaciones T366S, L368A y Y407V y opcionalmente la mutación Y349C.

8. El polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, caracterizado por que

a) R1 y R2 del primer y segundo polipéptido son idénticos,
b) R1 y R2 del primer polipéptido de fusión son idénticos, R1 y R2 del segundo polipéptido de fusión son idénticos pero diferentes de R1 y R2 del primer polipéptido de fusión,
c) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y R2 del primer y segundo polipéptido son idénticos pero diferentes de R1,
d) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y ambos R2 están ausentes,
e) R1 del primer y segundo polipéptido de fusión son diferentes y ambos R2 están ausentes,
f) R2 del primer y segundo polipéptido de fusión son idénticos y ambos R1 están ausentes,
g) R2 del primer y segundo polipéptido de fusión son diferentes y ambos R1 están ausentes,
h) R1 del primer polipéptido de fusión y R2 del segundo polipéptido de fusión son diferentes y R2 el primer polipéptido de fusión está ausente y R1 del segundo polipéptido está ausente.

9. Método para la producción de un receptor Fc soluble que comprende las siguientes etapas

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,
c) opcionalmente, escindir el polipéptido de fusión con una proteasa

y producir de ese modo un receptor Fc soluble.

10. Uso de un polipéptido de fusión inmovilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como ligando de cromatografía de afinidad.

11. Uso de un polipéptido de fusión inmovilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para determinar la unión al receptor Fc de un anticuerpo.

12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado por que el polipéptido de fusión está unido a una fase sólida.

13. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

14. Uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de un medicamento.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado por que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

Fig. 1

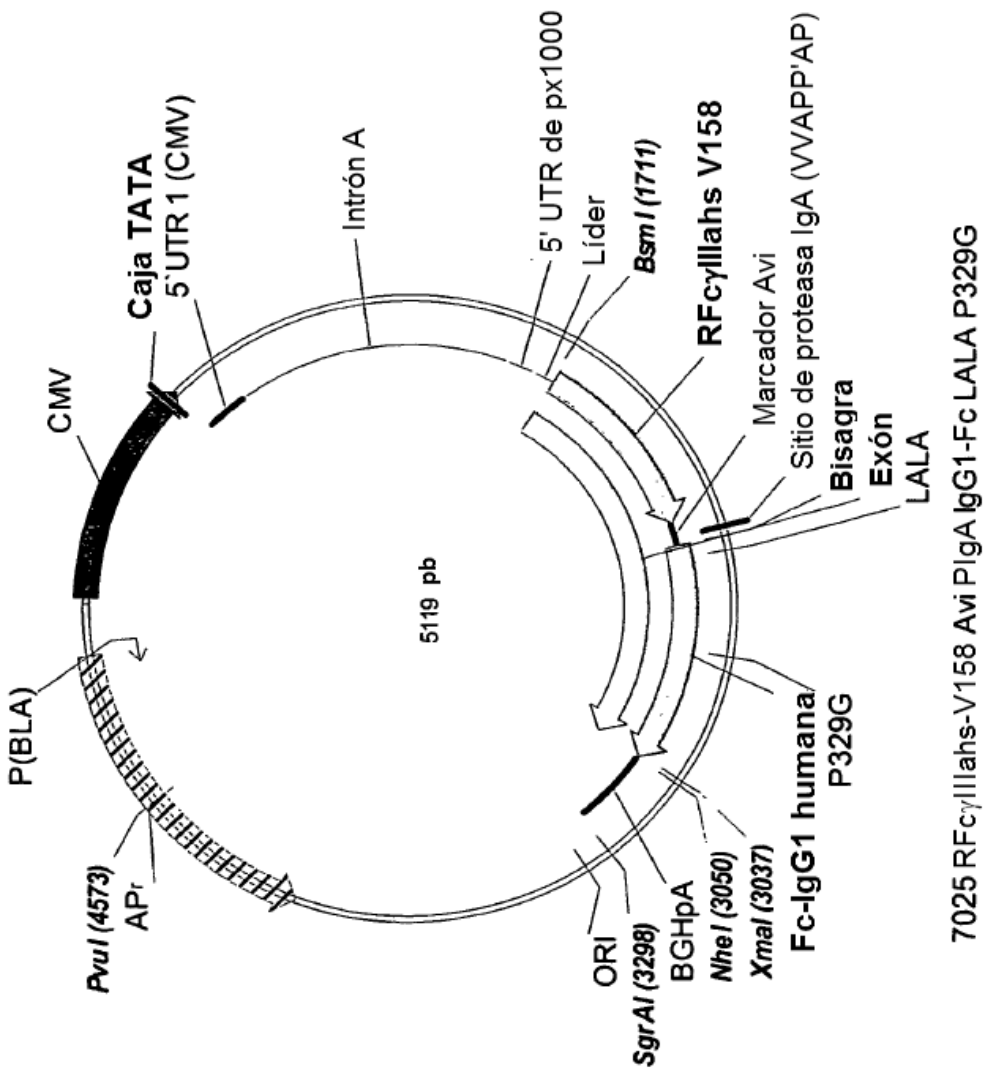

CMV
Caja TATA
5'UTR 1 (CMV)
Intrón A
5' UTR de px1000
Líder
BsmI (1711)
RFcγIIIahs V158
Marcador Avi
Sitio de proteasa IgA (VVAPP'AP)
Bisagra
Exón
LALA
P329G
Fc-IgG1 humana
XmaI (3037)
NheI (3050)
BGHpA
ORI
SgrAI (3298)
APr
PvuI (4573)
P(BLA)
5119 pb
7025 RFcγIIIahs-V158 Avi PIgA IgG1-Fc LALA P329G

Fig. 2

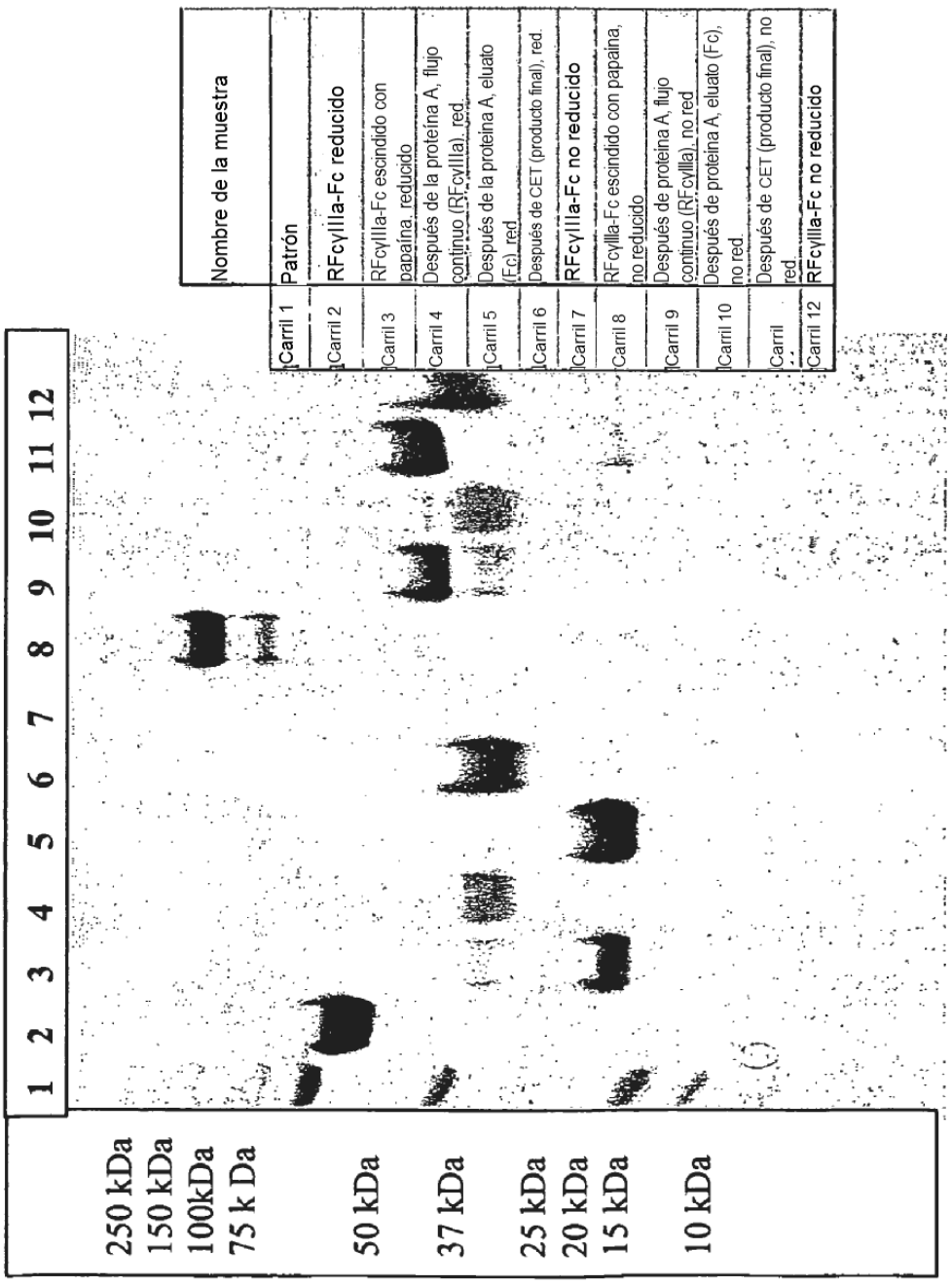

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
250 kDa
150 kDa
100kDa
75 k Da
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa
Nombre de la muestra
Carril 1 Patrón
Carril 2 RFcylIla-Fc reducido
Carril 3 RFcylIla-Fc escindido con papaína, reducido
Carril 4 Después de la proteína A, flujo continuo (RFcylIla), red.
Carril 5 Después de la proteína A, eluato (Fc) red
Carril 6 Después de CET (producto final), red.
Carril 7 RFcylIla-Fc no reducido
Carril 8 RFcylIla-Fc escindido con papaína, no reducido
Carril 9 Después de proteína A, flujo continuo (RFcylIla), no red
Carril 10 Después de proteína A, eluato (Fc), no red
Carril Después de CET (producto final), no red
Carril 12 RFcylIla-Fc no reducido

Fig. 3

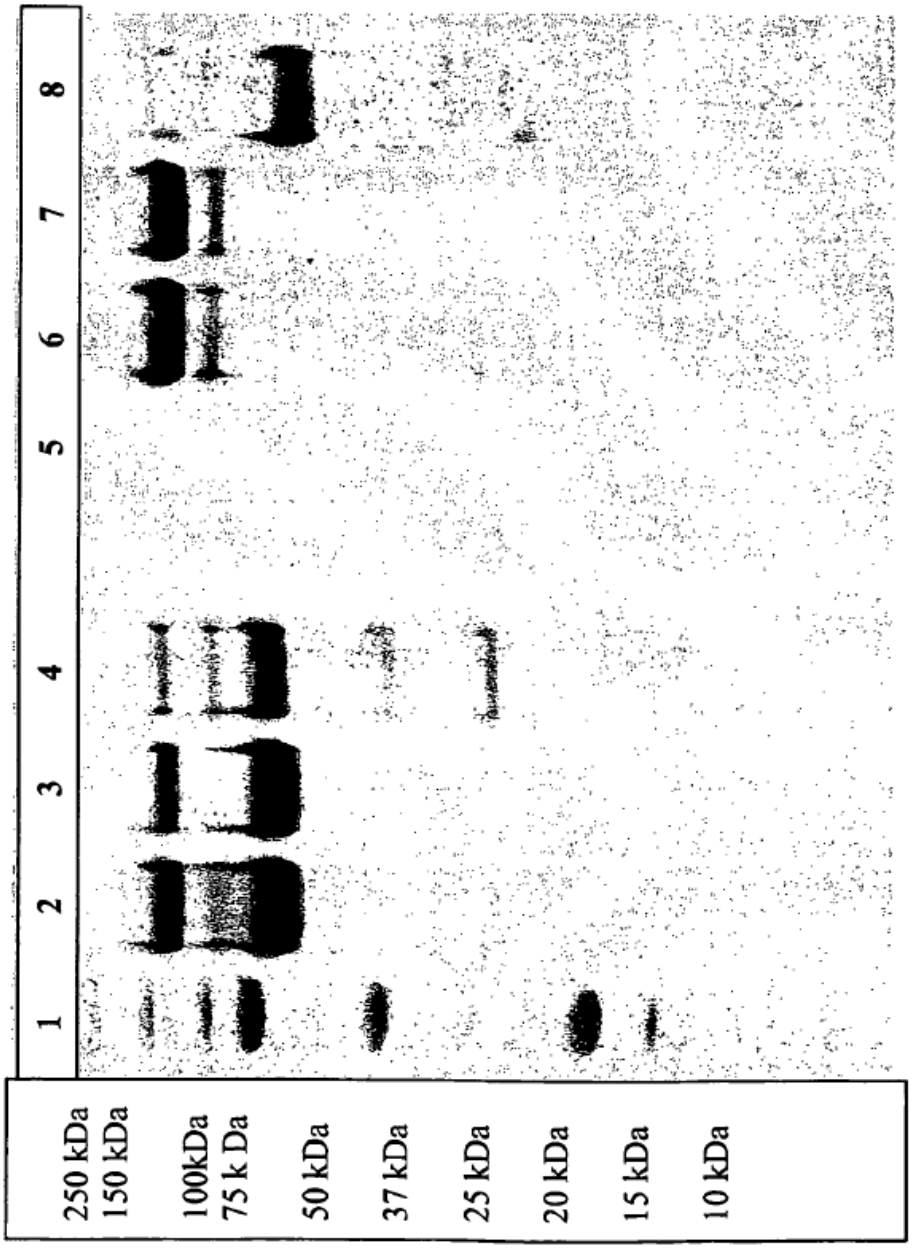

1
2
3
4
5
6
7
8
250 kDa
150 kDa
100kDa
75 k Da
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

Fig. 4

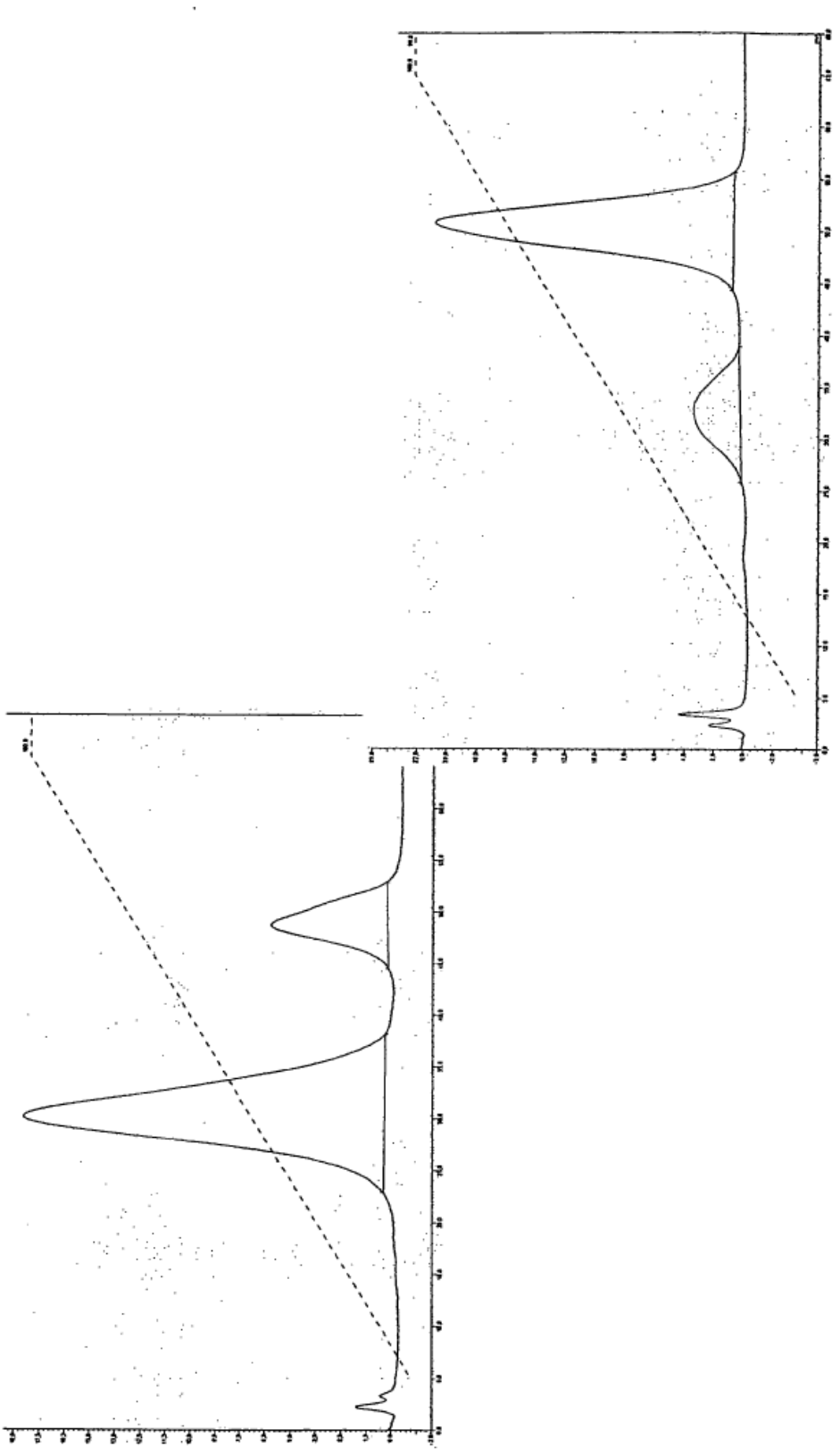


Fig. 5

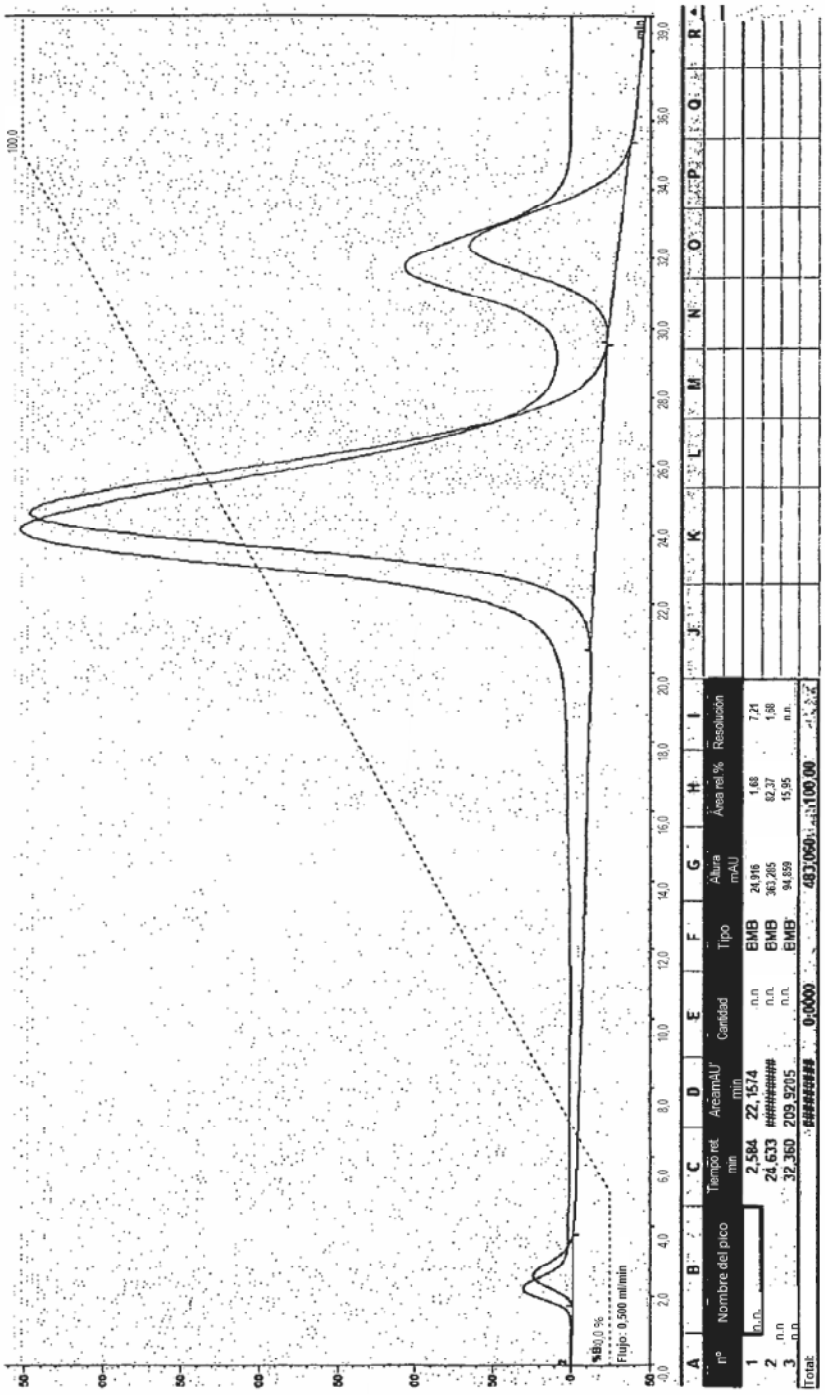

100,0
%B 0,0 %
Flujo: 0,500 ml/min
min
nº
Nombre del pico
Tiempo ret. min
AreamAU' min
Cantidad
Tipo
Altura mAU
Área rel.%
Resolución
1 n.n. 2,584 22,1574 n.n. BMB 24,916 1,68 7,21
2 n.n. 24,633 ######## n.n. BMB 363,285 82,37 1,68
3 n.n. 32,360 209,9205 n.n. BMB 94,859 15,95 n.n.
Total: ######## 0,0000 483,060 100,00

Fig. 6

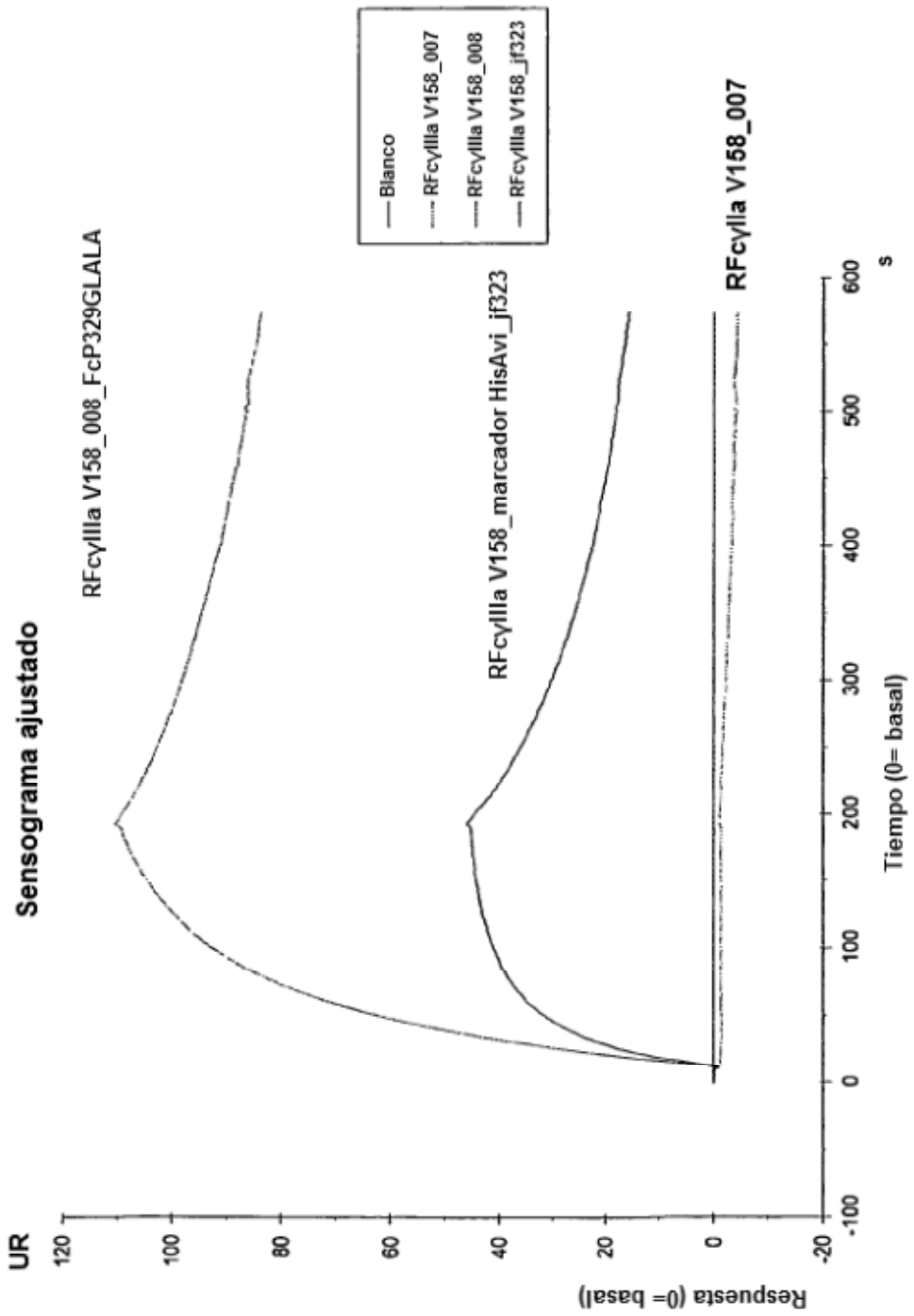

Sensograma ajustado
UR
Respuesta (0= basal)
Tiempo (0= basal)
s
Blanco
RFcylIIa V158_007
RFcylIIa V158_008
RFcylIIa V158_jf323
RFcylIIa V158_008_FcP329GLALA
RFcylIIa V158_marcador HisAvi_jf323
RFcylIIa V158_007

Fig. 7a

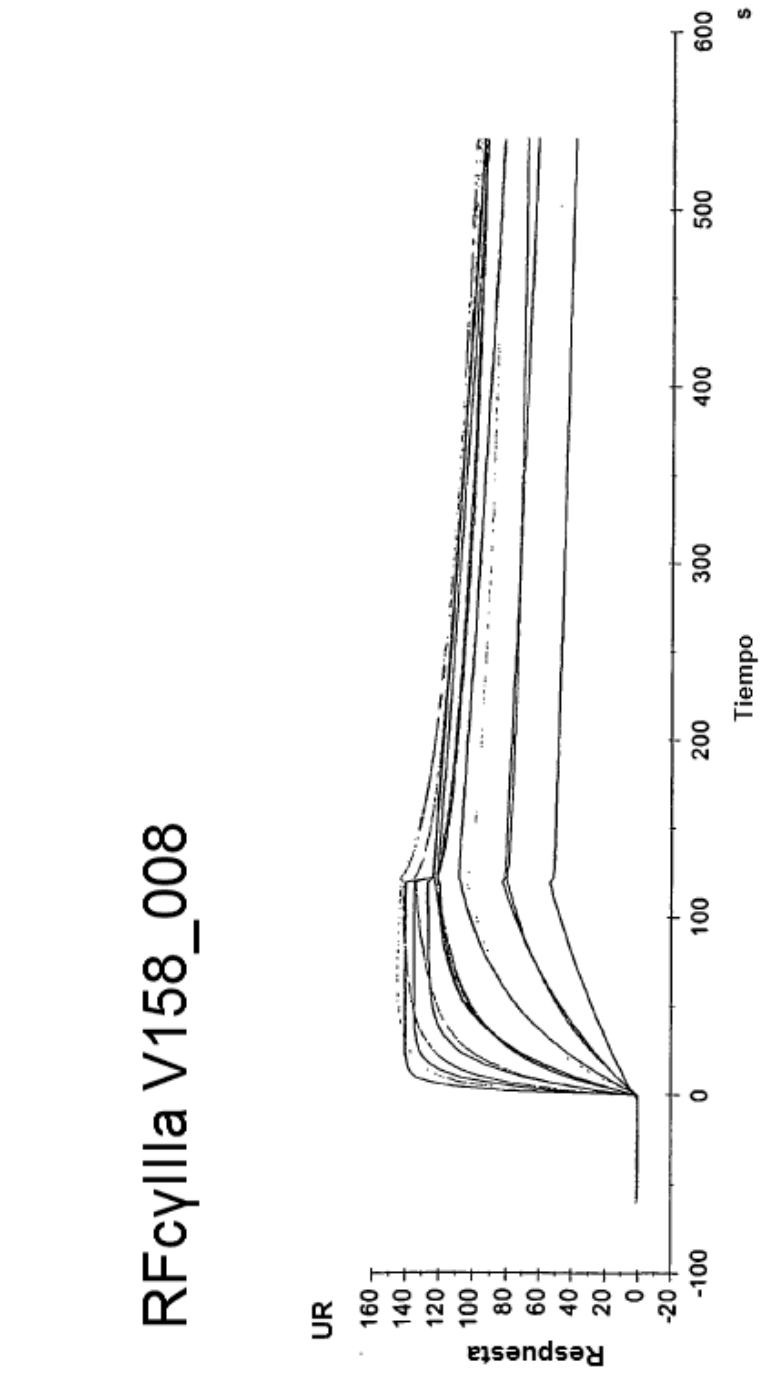

RFcγIIIa V158_008
UR
Respuesta
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-100
0
100
200
300
400
500
600
Tiempo
s
ka (1/Ms)
5,961E+5
kd (1/s)
6,535E-4
KD (M)
1,096E-9

Fig. 7b

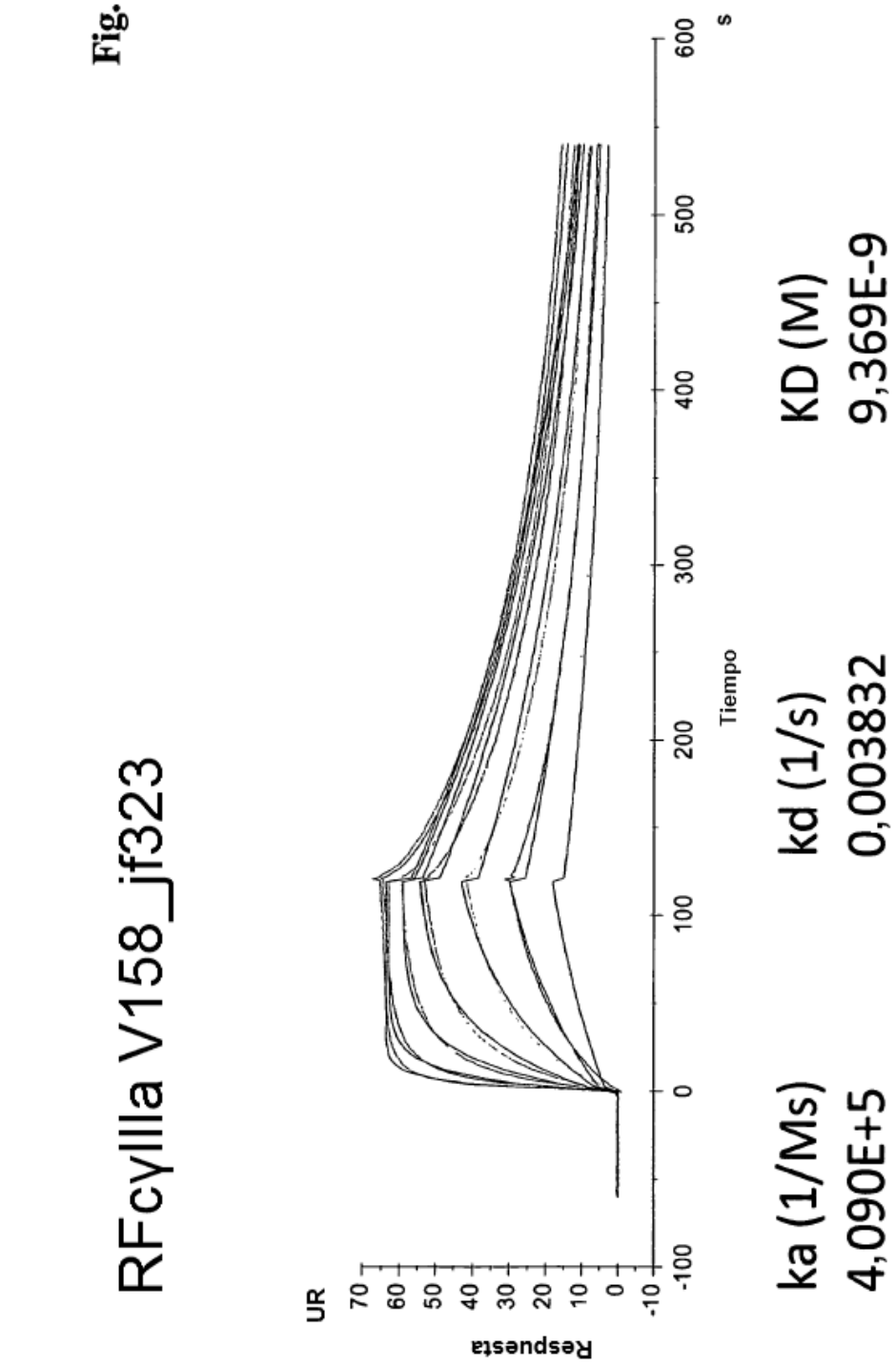

RFcylIIa V158_jf323
UR
Respuesta
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-100
0
100
200
300
400
500
600
s
Tiempo
ka (1/Ms)
4,090E+5
kd (1/s)
0,003832
KD (M)
9,369E-9

Fig. 7c

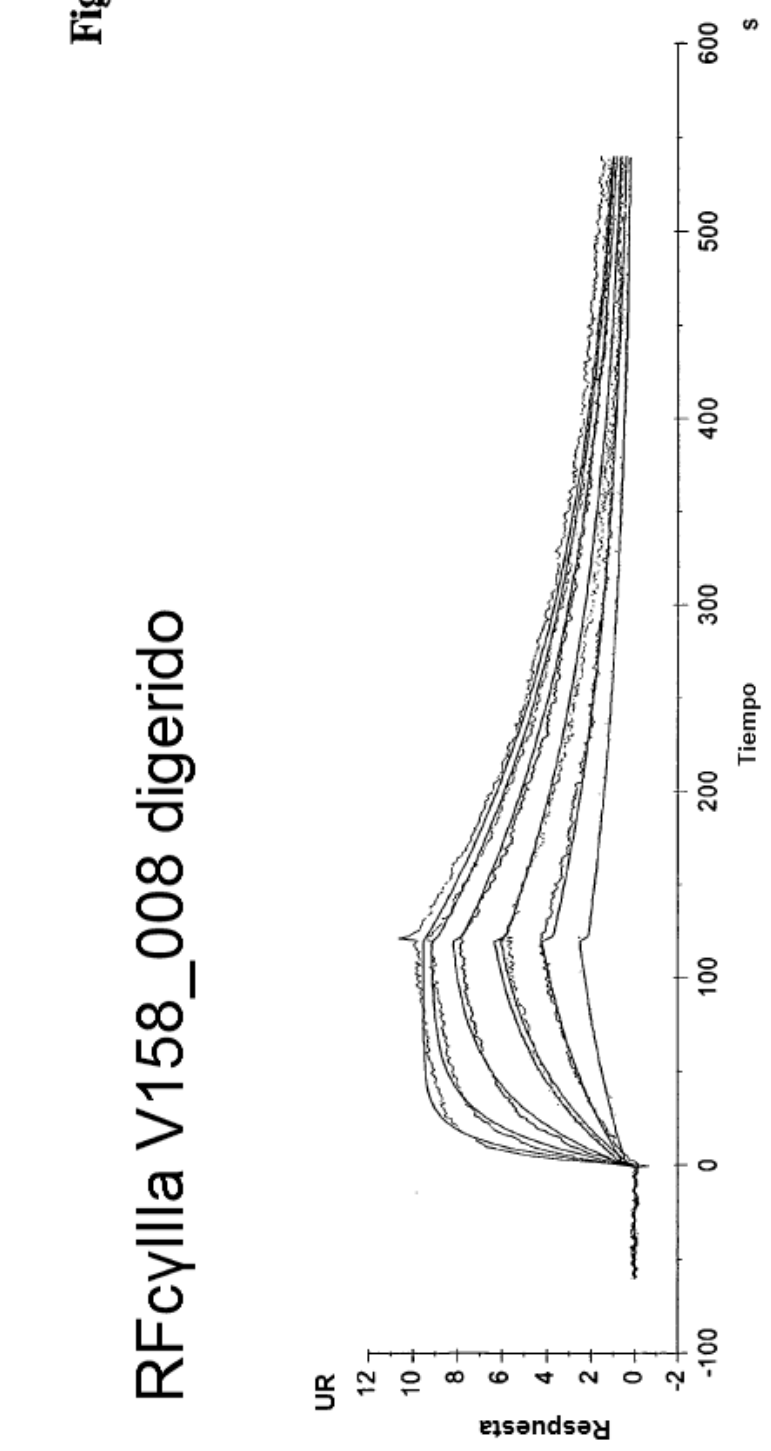
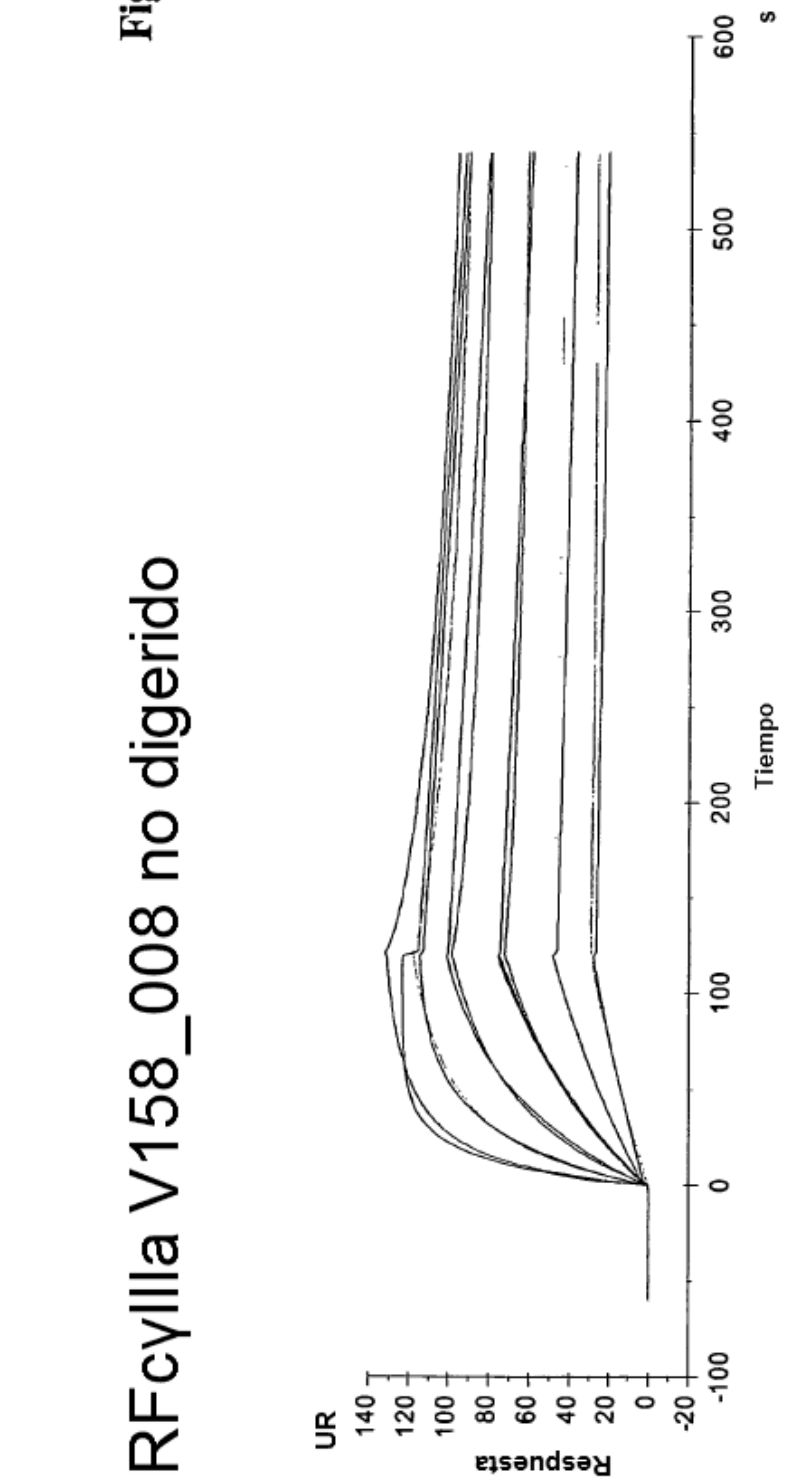

RFcylIla V158_008 digerido
UR
Respuesta
12
10
8
6
4
2
0
-2
-100
0
100
200
300
400
500
600
Tiempo
s
ka (1/Ms)
3,595E+5
kd (1/s)
0,005281
KD (M)
1,469E-8

Fig. 7d

RFcylIIa V158_008 no digerido



ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
2,846E+5	5,276E-4	1,854E-9