

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 925**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008** **E 12198380 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017** **EP 2662449**

54 Título: **Proteínas de fusión de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

30.05.2007 US 940753 P

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

12.07.2017

73 Titular/es:

**POSTECH ACADEMY-INDUSTRY- FOUNDATION
(50.0%)**

**San 31 Hyoja-dong
Pohang-city, Kyungbuk-do 790-784, KR y
GENEXINE, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SUNG, YOUNG CHUL y
YANG, SEHWAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 623 925 T3

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

Proteínas de fusión de inmunoglobulina

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una proteína Fc híbrida humana y a una proteína de fusión de inmunoglobulina en la que la proteína Fc híbrida humana se une a una molécula biológicamente activa. En particular, se refiere a una proteína Fc híbrida humana, que se deriva de combinaciones de subclases de la inmunoglobulina G humana (IgG) o combinaciones de la IgD y la IgG humanas, y una proteína de fusión en la que dicha proteína Fc está acoplada a una molécula biológicamente activa mediante un enlace covalente.

Antecedentes de la técnica

10 Las moléculas biológicamente activas pueden ser de gran interés terapéutico. Sin embargo, pueden tener desventajas como agente terapéutico porque su estabilidad *in vivo* es baja. Su semivida en circulación o semivida en suero es corta debido a que se digieren por diversas enzimas en el cuerpo vivo. Por tanto se ha deseado mejorar la semivida en circulación de las moléculas biológicamente activas.

15 Se sabe que aumentar el tamaño de una proteína puede aumentar su semivida, ya que se evita que el riñón elimine la proteína (Knauf y col., J. Biol. Chem. 1988. 263: 15064-15070). Por ejemplo, se ha notificado un aumento de la estabilidad de la proteína mediante el acoplamiento de una proteína activa con la albúmina humana (Kinstler y col., Pharm. Res. 1995. 12: 1883-1888). Sin embargo, como el acoplamiento de una proteína activa con la albúmina humana aumenta solo ligeramente su tiempo de residencia, no ha sido un procedimiento eficaz para desarrollar una formulación farmacéutica eficaz que contenga la proteína activa que se acopla a la albúmina humana.

20 El otro procedimiento notificado es modular la glicosilación de una proteína. La glicosilación adicional en la proteína y la introducción de ácidos siálicos en las proteínas conducen a la prevención de la degradación de las proteínas en el hígado. Sin embargo, el aumento en la glicosilación de las proteínas conduce también a una disminución de la bioactividad de las proteínas.

25 Para estabilizar las proteínas y evitar la depuración renal, las proteínas se han conjugado con polietilenglicol. Se ha utilizado ampliamente la conjugación covalente con el PEG para administrar un fármaco de una semivida prolongada (Delgado y col., 1991. 9. 249-304). Sin embargo, se ha notificado que la conjugación de PEG con citocinas u hormonas da como resultado una afinidad de unión reducida del receptor debido al impedimento estérico producido por la conjugación.

30 Recientemente, se han investigado y desarrollado proteínas de fusión preparadas utilizando una inmunoglobulina (Ig). La Ig es un componente principal de la sangre. La Ig humana (hIg) incluye diversos tipos tales como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (Roitt y col., "Immunology" 1989, Gower Medical Publishing, Londres, Reino Unido; Nueva York, N. Y.). Las IgG humanas se pueden clasificar adicionalmente en diversas subclases conocidos como IgG1 humana (hIgG1), IgG2 humana (hIgG2), IgG3 humana (hIgG3), e IgG4 humana (hIgG4).

35 Las inmunoglobulinas están constituidas por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que están asociadas mediante enlaces disulfuro para formar tetrámeros. Cada cadena está compuesta por una región variable y una región constante. La región constante de la cadena pesada se divide además en tres o cuatro regiones (CH1, CH2, CH3 y CH4), dependiendo de los isotipos. La porción Fc de la región constante de la cadena pesada, dependiendo del isotipo de Ig, incluye los dominios bisagra, CH2, CH3 y/o CH4.

40 Con respecto a la semivida en suero, la IgG1, IgG2 e IgG4 tienen semividas largas de 21 días, mientras que otras inmunoglobulinas tienen semividas relativamente cortas, de menos de una semana. Las proteínas quiméricas fusionadas con una porción de Fc de la IgG muestran un aumento de la estabilidad y un aumento de la semivida en suero (Capon y col., Nature 1989. 337: 525-531). Las proteínas biológicamente activas se han fusionado en el extremo N de la región CH1, el extremo N de la región Fc, o el extremo C de la región CH3 de las IgG.

45 En el periodo inicial, se han creado las proteínas de fusión de la IgG con los dominios extracelulares de receptores superficiales celulares tales como CD4 (Capon y col., Nature 1989. 337: 525-531), TNFR (Mohler y col., J. Immunology 1993. 151: 1548-1561), CTLA4 (Linsley y col., J. Exp. Med. 1991. 173: 721-730), CD86 (Morton y col., J. Immunology 1996. 156: 1047-1054). También, existen algunas citocinas y hormonas de crecimiento que se han fusionado con los dominios de la IgG. Sin embargo, a diferencia de la fusión con los dominios extracelulares de los receptores superficiales celulares, la fusión con proteínas solubles con las IgG conduce a actividades biológicas reducidas, en comparación con las citocinas no fusionadas o los factores de crecimiento. Las proteínas quiméricas existen como dímeros, lo que conduce al impedimento estérico procedente de la interacción con sus receptores del tipo moléculas diana, debido a la presencia de dos proteínas activas en estrecha proximidad entre sí. Por tanto, debe superarse este problema para preparar una proteína de fusión eficaz.

55 La otra limitación de la tecnología de fusión de Fc es la presencia de respuestas inmunes indeseables. El dominio Fc de la inmunoglobulina tiene también funciones efectoras tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente

de anticuerpo (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Estas funciones efectoras se consiguen generalmente mediante la interacción entre la región Fc de la Ig y los FcR en las células efectoras o mediante la unión del complemento. Por tanto, debe llevarse a cabo el bloqueo de las funciones efectoras de la Fc para reducir las reacciones indeseables tales como la muerte celular, la liberación de citocinas, o la inflamación.

5 Divulgación de la invención

Problema técnico

En resumen, se necesitan proteínas de fusión de Fc mejoradas con una mínima pérdida de actividad biológica y con un riesgo disminuido de respuestas inmunes indeseadas.

Solución técnica

- 10 La presente invención proporciona una proteína Fc híbrida, que se deriva de combinaciones de subclases de la IgG humana o combinaciones de la IgD e IgG humanas. La región Fc híbrida es eficaz, cuando se une a una molécula biológicamente activa, para aumentar la semivida en suero de la molécula biológicamente activa así como para aumentar el nivel de expresión del polipéptido cuando se expresa un nucleótido que codifica una proteína de fusión del polipéptido Fc.
- 15 La presente invención proporciona también un polipéptido de fusión Fc híbrido en el que el Fc híbrido se une a una molécula biológicamente activa. La proteína de fusión se denomina algunas veces "proteína de fusión de Fc-molécula activa" o simplemente "proteína de fusión". La proteína de fusión puede tener un engarce entre la FC y la molécula biológicamente activa. La Fc puede estar acoplada en su extremo N con un extremo C de la molécula biológicamente activa.
- 20 La proteína de fusión puede producirse fabricando una construcción de nucleótidos que codifica y es capaz de expresar la proteína de fusión; expresándola en una célula huésped; y cosechar la proteína de fusión. De forma alternativa, la proteína de fusión puede producirse expresando un nucleótido que codifica la Fc y acoplando esta a una molécula biológicamente activa de una manera convencional.

- De acuerdo con esto, en un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que es una fusión que comprende (i) un polipéptido híbrido IgG-IgD y (ii) un polipéptido, una proteína o un péptido fusionado en el extremo N terminal o el extremo C terminal del polipéptido híbrido IgG-IgD, en el que (i) el polipéptido híbrido IgG-IgD está representado por la siguiente fórmula:



en la que:

- 30 N' es el extremo N y C' es el extremo C del polipéptido.
 Z1 es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 a 9 restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14;
 Y es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 o más restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14;
- 35 Z2 es una secuencia de aminoácidos que consta de 4 a 37 restos de aminoácidos consecutivos del lado del extremo N de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 163 a 199 de la SEQ ID NO: 14;
 Z3 es una secuencia de aminoácidos que consta de 73 a 106 restos de aminoácidos consecutivos del lado del extremo C de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 115 a 220 de la SEQ ID NO: 13;
 Z4 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13; y p es un número entero de 0 o 1; y
- 40

en el que (ii) el polipéptido, la proteína o el péptido es una hormona, una citocina, un factor de crecimiento, una molécula coestimulante, un receptor hormonal, un receptor de citocinas, un receptor del factor de crecimiento o un péptido corto.

- 45 Z1 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye 5-9 restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 90-98 de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, Z1 puede ser 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácidos del extremo C de un dominio CH1 de la IgG1 (SEQ ID NO: 11) o de un dominio CH1 de la IgD (SEQ ID NO: 14).

- Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye 5 o más, o 10 o más restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14.
- 50 En determinadas realizaciones, Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye restos de aminoácidos en las posiciones 158 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 153 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 143 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 133 a 162 de la SEQ ID NO: 14, o restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14.

Z2 pueden ser una secuencia de aminoácidos incluyendo de 4 a 37 o 6-30 restos de aminoácidos consecutivos del lado del extremo N de los restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 199 de SEQ ID NO: 14 (hIgD). En ciertas realizaciones, Z2 puede ser 6 restos de aminoácidos del extremo N de un dominio CH2 de la IgG2 humana u 8 restos de aminoácidos del extremo N de un dominio CH2 de la IgD humana.

5 El número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 puede estar entre 80 y 140. En una realización, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 está entre 90 y 120, ambos inclusive. En otra realización, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 está entre 105 y 115, ambos inclusive. En una realización, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 es 108. En una realización adicional, el número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 es 109.

10 Z4 puede ser una secuencia de aminoácidos de los restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13.

15 En una realización, el polipéptido puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27. El polipéptido es una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29.

20 En una realización, el polipéptido, se fusiona en su extremo N con una molécula biológicamente activa que muestra una semivida en circulación aumentada en comparación con la semivida en circulación de la forma nativa de dicha molécula biológicamente activa. La molécula biológicamente activa puede ser un polipéptido, una proteína o un péptido. La molécula biológicamente activa puede ser un fármaco polipeptídico, peptídico o proteico. La molécula biológicamente activa puede ser una proteína soluble tal como, pero sin limitarse a, una hormona, citocina, factor de crecimiento, una molécula coestimuladora, receptor de hormonas, receptor de citocinas, receptor de factores de crecimiento, o péptido corto. La molécula biológicamente activa puede ser EPO o sus variantes/fragmentos, p40 o sus variantes/fragmentos (por ejemplo, variante p40 que contiene una sustitución Asn303Gln, G-CSF o sus variantes/fragmentos, el receptor de TNF, G-CSF, el receptor de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-10, TGF-beta, el receptor de TGF-beta, IL-17, el receptor de IL-17, el Factor VII, CXCL-11, FSH, la hormona del crecimiento humano, la proteína-1 morfogenética del hueso (BMP-1), CTLA4, PD-1, GLP-1, la betacelulina, OPG, RNAK, el interferón alfa, el interferón beta o sus variantes/fragmentos. La molécula biológicamente activa puede ser una proteína secretada, que puede estar en una forma madura.

30 En una realización, se proporciona un procedimiento para producir el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende las etapas de. (i) introducir una molécula de ADN que codifica el polipéptido en una célula huésped de mamífero (ii) hacer crecer la célula en condiciones en las que se pueda expresar el polipéptido en su medio de crecimiento; y (iii) cosechar el polipéptido expresado. La célula huésped de mamífero puede ser una de entre células CHO, COS o BHK.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico como se describe en el presente documento para uso en un método de tratamiento médico.

40 En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. El polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29. La molécula de ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.

La molécula de ácido nucleico puede incluir además una secuencia señal o secuencia líder.

45 De acuerdo con una realización de la invención, se proporcionan un vector de expresión que incluye la molécula de ácido nucleico y una célula huésped que contiene el vector. Los ejemplos de vectores de expresión pueden incluir, pero no se limitan a, pAD11 ERO-hFc-1, pAD11 G-CSF-hFc1, pAD11 p40N303Q-hFc1, pAD11 ERO-hFc-6, pAD11 G-CSF-hFc-6, pAD11 p40N303Q-hFc6, pAD11 ERO-hFc-5, pAD11 G-CSF-hFc5, pAD11 p40N303Q-hFc5 y pAD11 TNFR-hFc-5.

50 En una realización, se proporciona un procedimiento para administrar una molécula biológicamente activa a un mamífero que incluye la etapa de administrar la molécula de ácido nucleico al mamífero que lo necesita.

55 En otra realización, un polipéptido incluye un dominio Fc que consta de una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 en una dirección del extremo N al extremo C, en el que dicha región bisagra incluye al menos una porción de restos de aminoácidos de una región bisagra de IgD o región bisagra de IgG1; dicho dominio CH2 incluye al menos una parte de restos de aminoácidos de un dominio CH2 de IgG4, en el que 4-37 restos de aminoácidos consecutivos en el extremo N del dominio CH2 de la IgG4 humana están sustituidos con al menos una porción de restos de aminoácidos de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgG2 humana o la región del extremo N del dominio CH2 de la IgD humana, y dicho dominio CH3 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos de un

dominio CH3 de la IgG4 humana.

La región bisagra puede incluir al menos una porción de restos de aminoácidos de la región bisagra de la IgG1 humana, dicho dominio CH2 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG4, en el que los 4-37 restos de aminoácidos en el extremo N del dominio CH2 de la IgG4 humana están sustituidos con al menos una porción de los restos de aminoácidos de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgG2 humana.

La región bisagra puede incluir al menos una porción de restos de aminoácidos de la región bisagra de la IgD humana, dicho dominio CH2 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH2 de la IgG4 humana, en el que 4-37 restos de aminoácidos en el extremo N del dominio CH2 de la IgG4 humana están sustituidos con al menos una porción de los restos de aminoácidos de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgD humana.

El polipéptido puede incluir además un dominio CH1, en el que dicho dominio CH1 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH1 de la IgG1 humana, y en el que dicho dominio CH1 está acoplado al extremo N de dicha región bisagra. El polipéptido puede incluir además un dominio CH1, en el que dicho dominio CH1 incluye al menos una porción de restos de aminoácidos del dominio CH1 de la IgD humana, y en el que dicho dominio CH1 está acoplado al extremo N de dicha región bisagra. El polipéptido puede incluir además un segundo polipéptido acoplado al extremo N de dicha región bisagra, en el que el segundo polipéptido es un polipéptido no de inmunoglobulina biológicamente activo. El polipéptido puede incluir además una molécula biológicamente activa acoplada al extremo N de dicho dominio CH1 o al extremo C de dicho dominio CH4 mediante un engarce, en el que dicha molécula biológicamente activa no es un polipéptido de la inmunoglobulina. El polipéptido y la molécula biológicamente activa pueden estar acoplados entre sí mediante un engarce. La molécula de engarce es una albúmina de engarce o un engarce sintético. La albúmina de engarce comprende la secuencia de aminoácidos 321 a 323, 318 a 325, 316 a 328, 313 a 330, 311 a 333 o 306 a 338 de la SEQ ID NO: 25. El engarce sintético puede ser un péptido de 10 a 20 restos de aminoácidos compuestos por restos de Gly y Ser. En una realización, dicho engarce de Gly-Ser es GGGGSGGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 32).

La presente invención abarca también una molécula de anticuerpo que comprende una región Fc recombinante, la región Fc recombinante se describe como anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el diagrama esquemático de las Fc híbridas (hFc) que se pueden usar como proteínas portadoras de moléculas activas designadas como "X".

La Fig. 2 muestra las representaciones esquemáticas de las hFc siguiendo la descripción detallada de las posiciones de aminoácidos derivadas de la IgG1 (SEQ ID NO: 11), IgG2 (SEQ ID: 12), IgG4 (SEQ ID: 13) e IgD (SEQ ID: 14). Se aplica la misma regla a la designación de las posiciones de aminoácidos en el polipéptido a lo largo de la solicitud, a no ser que se indique otra cosa.

La Fig. 3 muestra la representación esquemática de las hFc que están cada una conjugada con moléculas biológicamente activas designadas como "X" en el extremo C mediante un engarce peptídico de albúmina designado como "AL".

La Fig. 4 muestra las representaciones esquemáticas de las hFc conjugadas con engarces siguiendo la descripción detallada acerca de las posiciones de los aminoácidos de los engarces de la albúmina derivados de la albúmina humana (SEQ ID NO: 25).

La Fig. 5 muestra los resultados de la gráfica de hidrofobicidad de la hFc-6.

La Fig. 6(a) muestra los resultados de las actividades de unión de FcγRI de MabThera® (Rituximab), hlgG1, Enbrel® (etanercept), EFO-hFc-5, G-CSF-hFc-5, p40N303Q-hFc-5 utilizando el ensayo ELISA específico; la Fig. 6(b) muestra los resultados de las actividades de unión de Clq de MabThera® (Rituximab), hlgG1, Enbrel® (etanercept), EFO-hFc-5, G-CSF-hFc-5, p40N303Q-hFc-5 utilizando el ensayo ELISA específico.

La Fig. 7(a) muestra los resultados de las bioactividades de EPO-IgG1 Fc, EFO-hFc-1, EFO-hFc-5, EPO-hFc-6 y Aranesp® (darbepoetina alfa), en comparación con la de EPO en la línea celular F36E; la Fig. 7(b) muestra los resultados de las bioactividades *in vitro* de Neulasta® (pegfilgrastim) y G-CSF-hFc-5 en una línea celular hematopoyética de ratón (NFS-60); la Fig. 7(c) muestra los resultados de bioactividades *in vitro* de p40 y p40N303Q-hFc-5 en PBMC humanas; la Fig. 7(d) muestra los resultados de bioactividades *in vitro* de Enbrel® (etanercept) y TNFR-hFc-5 en células L929 murinas, y la Fig. 7(e) muestra los resultados de las bioactividades *in vitro* de thFc-1-AL(0)-IFN-beta and thFc-1-AL(3)-IFN-beta en células WISH humanas.

La Fig. 8(a) muestra los resultados de la semivida *in vivo* de Aranesp® (darbepoetina alfa), EPO-hFc-1, o EPO-hFc-5 administrados a monos cynomolgus mediante la ruta SC (panel izquierdo) y la ruta IV (panel derecho), la Fig. 8(b) muestra los resultados de la farmacocinética de LEUCOSTIM® (filgrastim) y G-CSF-hFc-1 administrados a ratas Sprague Dawley mediante la ruta SC (panel izquierdo) y la ruta IV (panel derecho), la Fig. 8(c) muestra los resultados de la farmacocinética de p40N303Q-hFc-5 and Enbrel® (etanercept) administrados a monos cynomolgus mediante la ruta SC. La Fig. 8(d) muestra los resultados de la farmacocinética de TNFR-hFc-5 y Enbrel® (etanercept) administrados a ratas Sprague Dawley mediante la ruta SC.

La Fig. 9(a) muestra los resultados de las bioactividades *in vivo* de Aranesp® (darbepoetina alfa) y EPO-hFc-5 administrados a monos cynomolgus mediante la ruta SC (panel superior izquierdo) y la ruta IV (panel superior derecho) y la Fig. 9(b) muestra los resultados de las bioactividades *in vivo* de LEUCOSTIM® (filgrastim) y G-

CSF-hFc-1 administrados a ratas Sprague Dawley mediante la ruta SC (panel superior) y la ruta IV (panel inferior).

Mejor modo de llevar a cabo la invención.

5 La presente invención proporciona un fragmento Fc híbrido de la inmunoglobulina humana que incluye una región bisagra, y un dominio CH2 y un dominio CH3 en una dirección del extremo N al extremo C, en el que la región bisagra es una secuencia de aminoácidos al menos parcial de una región bisagra de la IgD humana o una región bisagra de la IgG1 humana; y el dominio CH2 es un dominio CH2 de la IgG4 humana, una porción del cual, en su región del extremo N, está sustituida por 4-37 restos de aminoácidos de una región del extremo N de un dominio CH2 de la IgG2 humana o un dominio CH2 de la IgD humana. Dicho fragmento Fc híbrido, cuando se une a una molécula biológicamente activa, tal como un polipéptido biológicamente activo de la molécula biológicamente activa, para producir una proteína de fusión de Fc, minimiza las inmunorreacciones no específicas de la proteína de fusión de Fc, prolonga la semivida en suero del polipéptido biológicamente activo de la molécula biológicamente activa, y optimiza la actividad del polipéptido biológicamente activo de la molécula biológicamente activa.

15 En la proteína de fusión de Fc de acuerdo con una realización de la presente invención, la combinación del extremo N del dominio CH2 de la IgD con la porción restante del dominio CH2 de la IgG4 se ha diseñado para que la región de la proteína de fusión resultante en la que dos diferentes subunidades de Ig se recombinan sea hidrófoba. La región hidrófoba de la proteína fusionada resultante se localizará en el interior de una proteína plegada, minimizando la reacción inmune no específica no deseada.

20 La expresión "fragmento Fc" o "Fc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que contiene la región 1 constante de la cadena pesada. (CH1), la región 2 constante de la cadena pesada (CH2) y la región 3 constante de la cadena pesada (CH3) de una inmunoglobulina, y no las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, y la región 1 constante de la cadena ligera (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir adicionalmente la región bisagra en la región constante de la cadena pesada. Fc híbrido o fragmento Fc híbrido se denomina algunas veces en el presente documento "hFc".

25 Además, el fragmento Fc de la presente invención puede estar en la forma de tener cadenas naturales de azúcar, un mayor número de cadenas de azúcar en comparación con una forma natural o un menor número de cadenas de azúcar en comparación con la forma natural, o puede estar en forma desglicosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar del Fc de la inmunoglobulina se pueden conseguir mediante procedimientos habituales en la técnica, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética utilizando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de un fragmento Fc da como resultado una fuerte disminución en la afinidad de unión a la parte C1q del primer componente C1 del complemento y una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), no induciendo de esta forma respuestas inmunes innecesarias *in vivo*. A este respecto, un fragmento Fc de la inmunoglobulina en una forma desglicosilada o aglicosilada puede ser, en algunos casos, más adecuado para el objeto de la presente invención como vehículo farmacológico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "desglicosilación" se refiere a que se eliminan enzimáticamente restos de azúcar de un fragmento Fc, y el término "aglicosilación" significa que se produce un fragmento Fc en una forma no glicosilada por un procarionte, preferiblemente *E. coli*.

40 El término "híbrido", tal como se usa en el presente documento, significa que las secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulinas de diferente origen están presentes en un fragmento Fc de inmunoglobulina monocatenario.

45 En una realización, el Fc humano híbrido incluye una región bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3 en una dirección del extremo N al extremo C, en el que la región bisagra es una secuencia de aminoácidos al menos parcial de una región bisagra de la IgD humana o una región bisagra de la IgG1 humana; y el dominio CH2 es un dominio CH2 de la IgG4 humana, una porción del cual, en su región del extremo N, está sustituida por 4-37 restos de aminoácidos de una región del extremo N de un dominio CH2 de la IgG2 humana o un dominio CH2 de la IgD humana. El Fc híbrido humano se puede unir por su extremo N al extremo C de una molécula biológicamente activa mediante un enlace covalente.

50 Los polipéptidos de la fórmula N'-X-(Z1)_p-Y-Z2-Z3-Z4-C' y N'-(Z1)_p-Y-Z2-Z3-Z4-(engarce)_q-X-C' aumentan la semivida en circulación de la molécula X biológicamente activa en comparación con la semivida en circulación de X solo, cuando se administran a un sujeto.

55 El engarce puede derivarse de la albúmina humana (CAA00606 SEQ ID NO: 25). El engarce puede comprender la secuencia de aminoácidos 321 a 323, 318 a 325, 316 a 328, 313 a 330, 311 a 333 o 306 a 338 de la SEQ ID NO: 25. De forma alternativa, el engarce puede ser un engarce sintético. El engarce sintético puede ser un péptido compuesto por un total de 10-20 restos de Gly y Ser. En una realización, el engarce de Gly-Ser es GGGGSGGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 32).

Z1 puede comprender al menos una porción del dominio CH1 de la IgD humana (SEQ ID NO: 14). Z1 puede comprender 5 a 9 o 7 a 9 restos de aminoácidos consecutivos de la región del extremo C del dominio CH1 de la IgD (posiciones 90-98 de la SEQ ID NO: 14). En algunas realizaciones, Z1 puede tener 5, 6, 7, 8 o 9 restos de aminoácidos en el extremo C del dominio CH1 de la IgG1 o dominio CH1 de la IgD.

5 En algunas realizaciones, Z1 es una secuencia de aminoácidos que incluye restos de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de SEQ ID NO: 14. Z1 puede ser una secuencia de aminoácidos que consiste en de 5 a 9 restos de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de SEQ ID NO: 14. Z1 también puede ser una secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 90 a 98 de SEQ ID NO: 14.

10 Y puede comprender al menos una porción de la región bisagra de la IgD humana. Y puede comprender 5 o más, o 10 o más restos de aminoácidos consecutivos de la región bisagra de la IgD del extremo C (aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14). En determinadas realizaciones, Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye restos de aminoácidos en las posiciones 158 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 153 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 143 a 162 de la SEQ ID NO: 14, restos de aminoácidos en las posiciones 133 a 162 de la SEQ ID NO: 14, o restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14.

Z2 puede comprender 4 a 37, 6 a 30, 6 a 12, 6 a 8, 8 o 6 restos de aminoácidos de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgD (los restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 199 de la SEQ ID NO: 14). En ciertas realizaciones, Z2 puede ser 8 restos de aminoácidos del extremo N de un dominio CH2 de la IgD humana (los restos de aminoácidos 163-170 de la SEQ ID NO: 14).

20 El número total de restos de aminoácidos de Z2 y Z3 puede ser entre 90 y 120, ambos inclusive, o 105 y 115, ambos inclusive.

25 Z4 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye 90 o más, o 100 o más restos de aminoácidos consecutivos del dominio CH3 de la IgG4 (restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13). Z4 puede ser de restos de aminoácidos de más del 98 % o 95 % de los restos de aminoácidos del dominio CH3 de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En una realización ejemplar, Z4 es una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos completa del dominio CH3 de la IgG humana. Por ejemplo, Z4 es la secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de la IgG4 humana, que corresponde a los restos de aminoácidos 341-447 de la IgG4 humana, tal como se numeran de acuerdo con el Índice EU, Kabat (que corresponden a los restos de aminoácidos en las posiciones 221-327 de la SEQ ID NO: 13).

30 En otra realización, Y puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una porción de la región del extremo C de la región bisagra de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14), p puede ser 1 o 0 (cero), Z2 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una porción de la región del extremo N del dominio CH2 de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 199 de la SEQ ID NO: 14), y Z3 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una porción de la región del extremo C del dominio CH2 de la IgG4 humana (restos de aminoácidos en las posiciones 121 a 220 de la SEQ ID NO: 13). Por ejemplo, Y puede ser restos de aminoácidos en las posiciones 158 a 162, 133 a 162, o 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14, Z2 puede ser los restos de aminoácidos en las posiciones 163 a 170 de la SEQ ID NO: 14, y Z3 puede ser los restos de aminoácidos en las posiciones 121-220 de la SEQ ID NO: 13.

40 En esta realización, cuando p es 1, Z1 puede ser una secuencia de aminoácidos que incluye la región del extremo C del dominio CH1 de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14). Por ejemplo, Z1 puede ser los restos de aminoácidos 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14.

45 En esta realización, Y puede ser 20 restos de aminoácidos consecutivos o más, 30 restos de aminoácidos consecutivos o más, 40 restos de aminoácidos consecutivos o más, 50 restos de aminoácidos consecutivos o más, o 60 restos de aminoácidos consecutivos o más del lado del extremo C de la región bisagra de la IgD humana (restos de aminoácidos en las posiciones 99-162 de la SEQ ID NO: 14). Z3 puede comprender 71 a 100 restos de aminoácidos consecutivos del lado del extremo C de los restos de aminoácidos en las posiciones 121-220 de la SEQ ID NO: 13. El número total de los restos de aminoácidos de Z2 y Z3 puede ser 108.

La Tabla 1 muestra las secuencias de aminoácidos de los fragmentos de la IgG1, IgG2, IgG3 e IgD humana útiles en la construcción de los hFc de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

50 Tabla 1

[Tabla 1]

ES 2 623 925 T3

[Tabla]

dominio hFc	Intervalo aceptable de los fragmentos de Ig	Secuencia de los fragmentos más largos en el intervalo aceptable, en la dirección del extremo N al extremo C	SEQ ID NO:	Localización en la SEQ ID	Localización en el índice EU *
CH1(Z1)	5-9 restos de aminoácidos del extremo C del CH1 de la IgG1	SNTK<u>V</u>DKRV**	11	90-98	207-215
	5-9 restos de aminoácidos del extremo C del CH1 de la IgD	ASKS<u>K</u>KEIF	14	90-98	No disponible
Bisagra (Y)	5-15 restos de aminoácidos del extremo C de la región bisagra de la IgG1	EPKSCDKTHT<u>C</u>PPCP	11	99-113	216-230
	5-64 aminoácidos del extremo C de la región bisagra de la IgD	RWPESPKAQASSVPT AQPQAEGSLAKATTA PATRNTGRGGEEKK KEKEKEEQEERETK<u>T</u> <u>E</u>CP	14	99-162	No disponible
CH2, lado del extremo N (Z2)	4-37 restos de aminoácidos del extremo N	<u>A</u>PPVAGFSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTWV VVDVSH	12	111-147	231-267
	4-37 restos de aminoácidos del extremo N del dominio CH2 de la IgD	<u>S</u>HTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFV VGSDLKD	14	163-199	No disponible

(continuación)

dominio hFc	Intervalo aceptable de los fragmentos de Ig	Secuencia de los fragmentos más largos en el intervalo aceptable, en la dirección del extremo N al extremo C	SEQ ID NO:	Localización en la SEQ ID	Localización en el índice EU *
CH2, lado del extremo C (Z3) + CH3 (Z4)	71-106 restos de aminoácidos del extremo C del CH2 de la IgG4 + 80-107 restos de aminoácidos del extremo N del dominio CH3 de la IgG4	<p>LGGPSVFLFPPKPKDT</p> <p>LMISRTPEVTCVVVD</p> <p><u>VSQEDPEVOFNWYVD</u></p> <p><u>GVEVHNAKTKPREEO</u></p> <p><u>FNSTYRVVSVLTVLH</u></p> <p><u>ODWLNGKEYKCKVS</u></p> <p><u>NKGLFSSEKTISKAK</u></p> <p>+<u>GOPREPOVYTLPSQ</u></p> <p><u>EEMTKNOVSLTCLVK</u></p> <p><u>GFYPSDIAVEWESNG</u></p> <p><u>OPENNYKTPPVLD</u></p> <p><u>DGSFFLYSRLTVDKSR</u></p> <p><u>WOEGNVFSCSVMHE</u></p> <p>ALHNHYTQKSLSLSL</p> <p>GK</p>	13	115-220 + 221-327	235-340 + 341-447
	71-106 restos de aminoácidos del extremo C del CH2 de la IgG3 + 80-107 restos de aminoácidos del extremo N del dominio CH3 de la Ig3	<p>LGGPSVFLFPPKPKDT</p> <p>LMISRTPEVTCVVVD</p> <p><u>VSHEDPEVOEKWYVD</u></p> <p><u>GVEVHNAKTKPREEO</u></p> <p><u>YNSTFRVSVLTVLH</u></p> <p><u>ODWLNGKEYKCKVS</u></p> <p><u>NKALPAPIEKTISKTK+</u></p> <p><u>GOPREPOVYTLPSRE</u></p> <p><u>EMTKNOVSLTCPVKG</u></p> <p><u>FYPSDIAVEWESSGOP</u></p> <p><u>ENNYNTTPPMLDSG</u></p> <p><u>SFELYSKLTVDKSRW</u></p> <p><u>QOGNIFSCSVMHEAL</u></p> <p>HNRFTQKS LSLSPGK</p>	24	165-270 + 271-377	235-340 + 341-447

(continuación)

dominio hFc	Intervalo aceptable de los fragmentos de Ig	Secuencia de los fragmentos más largos en el intervalo aceptable, en la dirección del extremo N al extremo C	SEQ ID NO:	Localización en la SEQ ID	Localización en el índice EU *
	71-106 restos de los aminoácidos del extremo C del CH2 de la IG2 +	<u>VAGPSVFLFPPKPKDT</u> <u>LMISRTPEVTWVVVD</u> <u>VSHEDPEVOENWYVD</u> <u>GVEVHNAKTKPREEO</u> <u>ENSTFCVVSVLTVVH</u>	12	114-219 + 220-326	234-340 +341-447
	80-107 restos de aminoácidos del extremo N del dominio CH3 de la IgG2	<u>ODWLNGKEYKCKVS</u> <u>NKGLPAPIEKTISKTK-</u> <u>GOPREPOVYTLPSRE</u> <u>EMTKNOVSLTCLYKG</u> <u>FYPSDIAVEWESNGOP</u> <u>ENNYKTTPMLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QOQNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>			

(continuación)

dominio hFc	Intervalo aceptable de los fragmentos de Ig	Secuencia de los fragmentos más largos en el intervalo aceptable, en la dirección del extremo N al extremo C	SEQ ID NO:	Localización en la SEQ ID	Localización en el índice EU *
71-106 restos de aminoácidos del extremo C del CH2 de la IgG1 + 80-107 restos de aminoácidos del extremo N	LGGPSVFL FPPKPKDT LMISRTPE VTCVVVD <u>VSHEDPEV</u> <u>KFNWYVD</u> <u>GVEVHNA</u> <u>KTKPREEQ</u> <u>YNSTYRVV</u> <u>SVLTVLHO</u> <u>DWLNGKE</u> <u>YKCKVSN</u> <u>KALPAPIE</u> <u>KTISKAK+</u> <u>GOPREPOV</u> <u>YTLPSRD</u> <u>ELTKNOVS</u> <u>LTCLVKGE</u> <u>YPSDIAVE</u> <u>WESNGOPE</u> <u>NNYKTIPP</u> <u>VLDS DGSF</u> <u>FLYSKLTV</u> <u>DKSRWOO</u> <u>GNVFSCSV</u> MHEALHN HYTQKSLS LSPGK	11	118-223 + 224-330	235-340 341-447	

* El índice EU se describe en "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición, United States Department of Health and Human Services."

* La región subrayada en cada una de las secuencias de aminoácidos indica los fragmentos más cortos de los intervalos de restos de aminoácidos aceptables.

En una realización, la presente invención proporciona una Fc híbrida que es una de hFc-1, hFc-2, hFc-3, hFc-4, hFc-5 o hFc-6, tal como se muestra en las Fig. 1 y 2, o la thFc-1 o thFc-2 que se muestra en las Fig. 3 y 4. Aunque las Fig. 1 y 3 representan Fc bicatenarias, la presente invención también abarca moléculas de Fc híbridas monocatenarias. Las secuencias de aminoácidos de hFc-1 a hFc-6 se muestran en las SEQ ID NO: 18-23, respectivamente y las secuencias de aminoácidos de thFc-1 y thFc-2 se muestran en la SEQ ID NO: 28 y la SEQ ID NO: 29, respectivamente. La presente invención abarca también una molécula polinucleotídica que codifica la Fc híbrida. Incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de polinucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (hFc-1), SEQ ID NO: 2 (hFc-2), SEQ ID NO: 3 (hFc-3), SEQ ID NO: 4 (hFc-4), SEQ ID NO: 5 (hFc-5), SEQ ID NO: 6 (hFc-6), SEQ ID NO: 26 (thFc-1) y SEQ ID NO: 27 (thFc-2).

Se conocen en la técnica las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas y están depositadas en un depositario públicamente disponible. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la región constante de la IgG1 humana, la región constante de la IgG2 humana, la región constante de la IgG3 humana, la región constante de la IgG4 humana, y la región constante de la IgD humana están disponibles en CAA75032, CAC20455, CAC20456, AAH25985 y P01880, respectivamente. Estas secuencias se reprodujeron como la SEQ ID NO: 11, 12, 13 y 14, respectivamente.

Una molécula X biológicamente activa puede ser una proteína soluble. Puede incluir, pero no se limita a, una hormona, citocina, factor de crecimiento, molécula coestimuladora, receptor de hormonas, receptor de citocinas, receptor de factores de crecimiento o péptido corto. Por ejemplo, X puede ser un EPO, p40, G-CSF, receptor de TNF o sus variantes/fragmentos. X puede ser un GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, receptor de IL-10, TGF-beta, receptor de TGF-beta, IL-17, receptor de IL-17, Factor VII, CXCL-11, FSH, hormona del crecimiento humano, proteína 1 morfogenética del hueso, CTLA4, PD-1, GLP-1, betacelulina, OPG, RNAK, interferón alfa, interferón beta o sus variantes/fragmentos. Puede incluir también, pero sin limitarse a, una región Fab de un anticuerpo. La molécula biológicamente activa puede ser también una proteína secretada. En una realización, la molécula biológicamente activa no pertenece a la familia de las inmunoglobulinas.

El término "variante" se refiere a un polinucleótido o ácido nucleico que difiere de un ácido nucleico o polipéptido de referencia, pero que retiene las propiedades esenciales del mismo. Generalmente, las variantes son globalmente muy similares y, en muchas regiones, idénticas al ácido nucleico o polipéptido de referencia. También, el término "variante" se refiere a una porción biológicamente activa de un fármaco de molécula biológicamente activa, y que conserva al menos una de sus propiedades funcionales y/o terapéuticas tal como se describe en otra parte del presente documento o se conoce de otra forma en la técnica. Generalmente, las variantes son globalmente muy similares, y, en muchas regiones, idénticas a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés biológicamente activo.

La presente invención proporciona también proteínas que comprenden, o constan de forma alternativa de, una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, idéntica a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos, tal como se muestra en las SEQ ID NO: 18-23 y 28-29. Se proporcionan también fragmentos de estos polipéptidos. Son polipéptidos adicionales abarcados por la invención polipéptidos codificados por los nucleótidos que se hibridan con el complemento de una molécula de ácido nucleico que codifica los polipéptidos de la invención en condiciones de hibridación rigurosas (por ejemplo, hibridación con ADN unido a un filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6 x a aproximadamente 45 °C seguido por uno o más lavados en SSC 0,2 x, SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C) en condiciones muy rigurosas (por ejemplo, hibridación con ADN unido a un filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6 x a aproximadamente 45 °C, seguido por uno más lavados en SSC 0,1 x, SDS al 0,2 % a aproximadamente 68 °C), o en otras condiciones de hibridación rigurosas que conocen los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., eds., 1989 Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1 6.3.6 y 2.10.3). La invención también abarca polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

En un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido sujeto sea idéntica a la secuencia de consulta excepto en que la secuencia polipeptídica sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de consulta, hasta un 5 % de los restos de aminoácidos de la secuencia se puede insertar, eliminar o sustituir con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones de los extremos amino o carboxilo de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier sitio entre aquellas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia.

Desde el punto de vista práctico, se puede determinar de forma convencional utilizando programas informáticos conocidos si cualquier polipéptido particular es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de la albúmina de la invención o uno de sus fragmentos. Un procedimiento preferido para determinar la mejor correspondencia global entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, denominado también alineación de la

secuencia global, se puede determinar utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y col. (Comp. App. Biosd. 6: 237 245 (1990)). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y sujeto son ambas secuencias de nucleótidos o son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de la alineación de la secuencia global se expresa como porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos utilizados en la alineación de aminoácidos por FASTDB son: Matriz = PAM 0, valor k-tupla = 2, Penalización por desapareamiento = 1, Penalización por unión = 20, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación por corte = 1, Tamaño de ventana = longitud de la secuencia, Penalización por hueco = 5, Penalización por tamaño de hueco = 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos sujeto, lo que sea más corto.

La variante tendrá usualmente al menos 75 % (preferiblemente al menos aproximadamente 80 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una longitud de HA normal o de la proteína terapéutica que tenga la misma longitud que la variante. La homología o identidad en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos se determina mediante análisis BLAST (Herramienta Básica de Investigación de la Alineación Local), utilizando el algoritmo empleado por los programas blastn, blastx, tblastn y tblastx (Karlin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 2268 (1990) y Altschul, J. Mol. Evol. 36: 290 300 (1993), incorporados en su totalidad por referencia) que se hacen a medida para la investigación de la similitud de secuencia.

Las variantes de polinucleótidos de la invención pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Especialmente preferidas son las variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o supresiones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o las actividades del polipéptido codificado. Se prefieren las variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debidas a la degeneración del código genético. Además, se prefieren también las variantes de polipéptidos en las que menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, o 5-50, 5-25, 5-10, 1-5 o 1-2 aminoácidos se sustituyen, suprimen, añaden en cualquier combinación. Se pueden producir variantes de polinucleótidos por diversas razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador concreto (cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos por un hospedador bacteriano, tales como, levadura o *E. coli*).

A fin de construir diversas proteínas de fusión de Fc tales como la construcción de fusión EPO-Fc, la construcción de fusión G-CSF-Fc o la construcción de fusión p40-Fc humana, las secuencias de aminoácidos de la EPO humana, G-CSF humano, p40 humana, y el receptor de TNF humano están disponibles de NP_000790 (SEQ ID NO: 15), CAA27291 (SEQ ID NO: 16), AAG32620 (SEQ ID NO: 17) y NP_001057 (SEQ ID NO: 31), respectivamente. En una realización, está vinculada al polipéptido una p40 humana en la que el resto del aminoácido Asn en la posición 303 está sustituido por Gln.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo completo que contiene la región Fc modificada por ingeniería genética. El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos que incluyen al menos dos de CH1, la región bisagra, CH2 o CH3. Se prefieren anticuerpos monoclonales completos. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo se selecciona por su especificidad de unión y puede ser de cualquier tipo, tal como, por ejemplo, no humana, humanizada o completamente humana. Cuando la región variable de la cadena pesada de la región variable del anticuerpo es no humana (tal como, por ejemplo, murina) y se combina de forma recombinante con una región Fc modificada por ingeniería genética de acuerdo con esta divulgación, el anticuerpo recombinante resultante se denomina anticuerpo quimérico. Si la región variable de la cadena pesada del anticuerpo está humanizada y se combina de forma recombinante con una región Fc modificada por ingeniería genética de acuerdo con esta divulgación, el anticuerpo recombinante resultante se denomina anticuerpo humanizado. Si la región variable de la cadena pesada del anticuerpo es humana y se combina de forma recombinante con una región Fc modificada por ingeniería genética de acuerdo con esta divulgación, el anticuerpo recombinante resultante se denomina anticuerpo completamente humano. Por ejemplo, la región variable de la cadena pesada está humanizada e incluye regiones marco conservadas humanas y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas (en este caso, murinas). Debe entenderse que las regiones marco conservadas se pueden derivar de una fuente o más de una fuente y que las CDR se pueden derivar de una fuente o más de una fuente. Los expertos en la técnica conocen los procedimientos de humanización de anticuerpos y estos se conocen en la técnica.

La cadena ligera del anticuerpo puede ser humana, no humana o humanizada. En la realización que se muestra en la Figura 1B, la cadena ligera está humanizada e incluye regiones marco conservadas humanas, CDR no humanas (en este caso murinas) y una región constante humana. Debe entenderse que las regiones marco conservadas se pueden derivar de una fuente o más de una fuente y que las CDR se pueden derivar de una fuente o más de una fuente.

El anticuerpo que contiene la región Fc modificada por ingeniería genética se selecciona basándose en su capacidad de unirse a una molécula superficial celular o a una molécula soluble que se une a una molécula superficial celular. De esta manera, por ejemplo, el anticuerpo se puede seleccionar basándose en su capacidad de unirse a las moléculas superficiales celulares tales como los receptores de citocina (por ejemplo, IL-2R, TNF- α R, IL-15R, etc.), moléculas de adhesión (por ejemplo, E-selectina, P-selectina, L-selectina, VCAM, ICAM, etc.), antígenos de diferenciación o activación celular (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, CD40, etc.), y otros. De forma alternativa, se puede seleccionar el anticuerpo basándose en su capacidad para unirse a una molécula soluble que

se une a moléculas superficiales celulares. Dichas moléculas solubles incluyen, pero no se limitan a, citocinas y quimiocinas (por ejemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, etc.), factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, PGDF, GCSF, HGF, IGF, BMP-1, etc.), moléculas que induce la diferenciación celular (por ejemplo, EPO, TPO, SCF; PTN, etc.), y otros.

- 5 En general, la construcción de los anticuerpos desvelados en el presente documento se consigue mediante el uso de manipulaciones reconocidas utilizadas en tecnología de ingeniería genética. Por ejemplo, se conocen generalmente en el campo técnicas para aislar el ADN, preparar y seleccionar vectores para expresar el ADN, purificar y analizar ácidos nucleicos, procedimientos específicos para preparar el ADN de un vector recombinante, escindir ADN con enzimas de restricción, unir ADN, introducir ADN incluyendo el ADN del vector en células huésped por medios estables o transitorios, cultivar las células huésped en medios selectivos o no selectivos para seleccionar y mantener células que expresan el ADN.

10 Los anticuerpos monoclonales desvelados en el presente documento se pueden derivar utilizando el procedimiento del hibridoma, que se conoce en la técnica, u otros procedimientos de ADN recombinante bien conocidos en la materia. En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado se inmuniza con ADN, péptidos o proteínas que estimulan la producción de anticuerpos por los linfocitos.

15 De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos producidos en respuesta al antígeno se fusionan a continuación con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Las células de hibridoma se siembran a continuación y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, apoyan la producción estable de anticuerpos mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y no son sensibles a un medio tal como el medio HAT (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., N° de catálogo H-0262).

20 Se pueden usar también los anticuerpos que contienen la región Fc modificada por ingeniería genética como composiciones administradas por separado proporcionadas junto con agentes terapéuticos. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos pueden estar marcados o no marcados.

25 Se pueden usar anticuerpos no marcados en combinación con otros anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios) que reaccionan con el anticuerpo modificado genéticamente, tal como anticuerpos específicos de las regiones constantes de la inmunoglobulina humana. De forma alternativa, los anticuerpos se pueden marcar directamente. Se puede emplear una amplia diversidad de marcadores, tales como radionúclidos, flúores, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, ligandos (particularmente haptenos), etc. Están disponibles numerosos tipos de inmunoensayos y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

30 De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para producir la proteína de fusión, cuyo procedimiento comprende: (i) introducir una molécula de ADN que codifica la proteína de fusión en una célula huésped de mamífero, (ii) hacer crecer la célula en condiciones en las que la proteína de fusión se exprese en su medio de crecimiento; y (iii) cosechar la proteína de fusión producida.

35 En otra realización a modo de ejemplo, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión o una molécula de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo descrito anteriormente. Se proporciona también un procedimiento para tratar o evitar determinados síntomas administrando la composición farmacéutica. Por ejemplo, se proporciona un procedimiento, que (i) reduce los síntomas de/evita/trata una enfermedad autoinmune, (□) inhibe el rechazo de un injerto, (□) trata/evita el choque inducido por una endotoxina, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de la Fc híbrida y una proteína p40 o sus variantes/fragmentos.

40 La composición puede comprender un vehículo farmacéutico. Un vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia no tóxica compatible para la administración de los anticuerpos al paciente. Pueden estar incluidos en el vehículo agua estéril, alcohol, grasas, ceras y sólidos inertes. Los adyuvantes farmacéuticamente aceptados (agentes tamponantes, agente dispersante) pueden incorporarse también a la composición farmacéutica.

45 Se pueden administrar las composiciones de anticuerpos a un sujeto de una diversidad de formas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de la proteína de fusión, el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo, desde menos de aproximadamente 0,5 %, usualmente a o al menos aproximadamente 1 % hasta como mucho 15 o 20 % en peso y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluidos, las viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

La presente invención proporciona también una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión, y un vector de expresión que transporta la molécula de ácido nucleico. Dicho ácido nucleico puede administrarse directamente a un sujeto que necesita un polipéptido codificado por el ácido nucleico. De forma alternativa, el polinucleótido se produce expresando el ácido nucleico en un medio y a continuación se administra a un sujeto.

El término "péptido", "polipéptido" o "proteína" se refiere a moléculas de 2 a 40 aminoácidos, prefiriéndose moléculas de 3 a 20 aminoácidos y prefiriéndose más las de 6 a 15 aminoácidos. Pueden generarse de forma aleatoria péptidos a modo de ejemplo mediante cualquier de los procedimientos citados anteriormente, portarse en una biblioteca de péptidos (por ejemplo, una biblioteca de expresión en fagos) o derivarse mediante digestión de proteínas.

El término "fármaco", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que muestra actividad terapéutica cuando se administra a seres humanos o animales, y los ejemplos del fármaco incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, compuestos, extractos y ácidos nucleicos. Se prefiere un fármaco de polipéptido.

Las expresiones "polipéptido fisiológicamente activo", "molécula biológicamente activa", "proteína fisiológicamente activa", "polipéptido activo", "fármaco de polipéptido" y "fármaco de proteína", tal como se usan en el presente documento, tienen un significado indistinto, y se caracterizan por que están en una forma fisiológicamente activa que presenta diversas funciones fisiológicas *in vivo*.

El fármaco de polipéptido tiene la desventaja de ser incapaz de mantener la acción fisiológica durante un largo periodo de tiempo debido a su propiedad de desnaturalizarse o degradarse fácilmente por las enzimas proteolíticas presentes en el cuerpo. Sin embargo, cuando el fármaco de polipéptido se une (o se acopla) a los fragmentos Fc de la inmunoglobulina de acuerdo con las realizaciones de la presente invención para formar una proteína de fusión, el fármaco tiene una mayor estabilidad estructural y semivida en suero. También, el polipéptido unido al fragmento Fc tiene una disminución mucho más pequeña en la actividad fisiológica que otras formulaciones de fármacos de polipéptido conocidas. Por tanto, en comparación con la biodisponibilidad *in vivo* de los fármacos de los polipéptidos convencionales, el polipéptido fusionado que comprende el fármaco de polipéptido y el fragmento Fc, o un conjugado del fármaco de polipéptido y del fragmento Fc de acuerdo con la presente invención se caracteriza por tener una biodisponibilidad *in vivo* notablemente mejorada. Esto se describe también claramente a lo largo de las realizaciones de la presente invención. Esto es, cuando se unen al fragmento Fc de la presente invención, IFN- α , G-CSF, EPO, p40, el receptor de TNF, y otros fármacos de proteínas presentaron un aumento en la biodisponibilidad *in vivo* en comparación con sus formas naturales u otras formas fusionadas convencionales.

Debe entenderse que la presente invención aprovecha metodologías de ADN recombinante para generar las proteínas de fusión de Fc, los anticuerpos que contienen la región Fc modificada por ingeniería genética de acuerdo con la presente invención y los fragmentos de anticuerpos útiles en la práctica de la invención. Las construcciones de fusión de Fc, se generan preferiblemente para el ADN, y los ADN resultantes se integran en vectores de expresión, y se expresan para producir las proteínas de fusión, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "vector" significa cualquier ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos competente para incorporarse en una célula huésped y que se va a recombinar con y a integrarse en el genoma de la célula huésped, o a replicarse de forma autónoma como un episoma. Dichos vectores incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos, vectores de ARN, vectores víricos y similares. Los ejemplos no limitantes de un vector vírico incluyen un retrovirus, un adenovirus, y un virus adenoasociado. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que las expresiones "expresión génica" o "expresión" de una proteína diana, significan la transcripción de una secuencia de ADN, traducción del transcrito de ARNm, y secreción de un producto de proteína de fusión de Fc o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Un vector de expresión útil es RcCMV (Invitrogen, Carlsbad) o sus variantes. El vector de expresión útil debe transportar el promotor de citomegalovirus humano (CMV) para promover la transcripción constitutiva del gen de interés en células de mamífero y transportar la secuencia señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino para aumentar el nivel del ARN en estado estacionario después de la transcripción. En una realización de la presente invención, el vector de expresión es pAD11, que es un vector modificado de RcCMV. Los ejemplos del vector de expresión que transporta una secuencia de nucleótidos que codifica un fármaco de una molécula biológicamente activa pueden incluir, y no se limitan a, pAD11 EPO-hFc-1, pAD11 G-CSF-hFc-1, pAD11 p40N303Q-hFc-1, pAD11 EPO-hFc-6, pAD11 G-CSF-hFc-6, pAD11 p40N303Q-hFc-6, pAD11 EPO-hFc-5, pAD11 G-CSF-hFc-5, pAD11 p40N303Q-hFc-5 o pAD 11 TNFR-hFc-5, tal como se describe con más detalle en los Ejemplos.

Una célula huésped adecuada puede ser un transformador transfectado con la secuencia de ADN de la invención, y utilizarse para la expresión y/o la secreción de la proteína diana. Las células huéspedes actualmente preferidas para uso en la invención incluyen células de hibridoma inmortalizadas, células de mieloma NS/0, células 293, células de ovario de hámster chino, células HeLa y células COS.

Un sistema de expresión que se ha usado para producir una expresión de alto nivel de las proteínas de fusión o el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo en las células de mamífero es una construcción de ADN que codifica, en la dirección 5' a 3', un casete de secreción, que incluye una secuencia señal y una región Fc de la inmunoglobulina, y una proteína diana tal como el receptor de p40, EPO, G-CSF, TNF. Se han expresado de forma satisfactoria algunas proteínas diana en dicho sistema e incluyen, por ejemplo, IL2, CD26, Tat, Rev, OSF-2, ss; IG-H3, el receptor de IgE, PSMA, y gp120. Se desvelan estas construcciones de expresión en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.541.087 y 5.726.044 de Lo y col, contenidos de las cuales se incorporan en presente documento por referencia.

Las proteínas de fusión o la molécula de anticuerpo o los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden incluir o no una secuencia señal cuando se expresan. Tal como se usa en la presente invención, se entiende que la expresión "secuencia señal" significa un segmento que dirige la secreción del fármaco de la molécula biológicamente activa; la proteína de fusión, y posteriormente se escinde tras la traducción en la célula huésped. La secuencia señal de la invención es un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. Las secuencias señal que son útiles en la invención incluyen secuencias señal de la cadena ligera del anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo 14.18 (Gillies y col., J. Immunol. Meth. 1989. 125: 191-202), secuencias señal de la cadena pesada del anticuerpo, por ejemplo, la secuencias señal de la cadena pesada del anticuerpo MOPC141 (Sakano y col., Nature 1980. 286: 676-683), y cualesquiera otras secuencias señal que se conozcan en la técnica (véase, por ejemplo, Watson y col., Nucleic Acids Research 1984. 12: 5145-5164).

Se han caracterizado bien en la técnica las secuencias señal y se sabe que contienen normalmente de 16 a 30 restos de aminoácidos, y pueden contener más o menos restos de aminoácidos. Un péptido señal típico consta de tres regiones, una región del extremo N básica, una región hidrófoba central y una región del extremo C más polar. La región hidrófoba central contiene 4 a 12 restos hidrófobos que se anclan al péptido señal a través de la bicapa de lípidos de la membrana durante el transporte del polipéptido naciente. Tras el inicio, el péptido señal se escinde normalmente en el interior de la luz del retículo endoplásmico por enzimas celulares conocidos como peptidasas señal. Los potenciales sitios de escisión del péptido señal siguen generalmente la "regla (-3, -1)". De esta manera, un péptido señal típico tiene pequeños restos de aminoácidos neutros en las posiciones -1 y -3 y carece de restos de prolina en esta región.

La peptidasa señal escindirá dicho péptido señal entre los aminoácidos -1 y +1. De esta manera, la secuencia señal se puede escindir a partir del término amino formado de la proteína de fusión durante la secreción. Esto da como resultado la secreción de una proteína de fusión de Fc consistente en la región de Fc de la inmunoglobulina y la proteína diana. Se proporciona un análisis detallado de las secuencias del péptido señal en von Heijne (1986) Nucleic Acids Res. 14: 4683.

Como será evidente para un experto en la técnica, la idoneidad de una secuencia señal concreta para uso en el casete de secreción puede requerir alguna experimentación rutinaria.

Dicha experimentación incluirá determinar la capacidad de la secuencia señal para dirigir la secreción de una proteína de fusión de Fc y también una determinación de la configuración óptima, genómica o el ADNc, de la secuencia que se va a usar con el fin de conseguir una secreción eficaz de las proteínas de fusión de Fc. De forma adicional, una persona experta en la técnica es capaz de crear un péptido señal sintético siguiendo las reglas presentadas por von Heijne (1986), y ensayar la eficacia de dicha secuencia señal sintética mediante la experimentación rutinaria. Se puede denominar una secuencia señal como "péptido señal", "secuencia líder" o "péptidos líder"

La fusión de la secuencia señal y la región Fc de la inmunoglobulina se denomina algunas veces casete de secreción. Un casete de secreción a modo de ejemplo útil en la práctica de la invención es un polinucleótido que codifica, en una dirección 5' a 3', una secuencia señal de un gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina y una región Fcy1 del gen y1 de la inmunoglobulina humana. La región Fcy1 del gen Fcy1 de la inmunoglobulina incluye preferiblemente al menos una porción del dominio bisagra de la inmunoglobulina y al menos el dominio CH3, o de forma más preferible al menos una porción del dominio bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que la "porción" de la región bisagra de la inmunoglobulina significa una porción de la bisagra de la inmunoglobulina que contiene al menos uno, preferiblemente dos restos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro entre cadenas. El ADN que codifica el casete de secreción puede estar en su configuración genómica o en su configuración de ADNc. En determinadas circunstancias, puede ser ventajoso producir la región Fc a partir de secuencias de la cadena pesada de la Fcy2 de la inmunoglobulina humana. Aunque las fusiones de Fc basadas en secuencias de inmunoglobulina humana y1 y y2 se comportan de forma similar en ratones, las fusiones de Fc basadas en las secuencias y2 pueden presentar una farmacocinética superior en seres humanos.

En otra realización, la secuencia de ADN que codifica un sitio de escisión proteolítica intercalado entre el casete de secreción y la proteína diana. Un sitio de escisión proporciona la escisión proteolítica de la proteína de fusión codificada separando de esta manera el dominio Fc de la proteína diana. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que "sitio de escisión proteolítica" significa las secuencias de aminoácidos que se escinden preferentemente por una enzima proteolítica u otros agentes de escisión proteolítica. Los sitios de escisión

proteolítica útiles incluyen secuencias de aminoácidos que se reconocen por las enzimas proteolíticas tales como tripsina, plasmina o enteroquinasa K. Se conocen muchas parejas de sitio de escisión/agente de escisión (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.726.044)

5 Además, sería también útil la sustitución o supresión de las construcciones de estas regiones constantes, en las que uno o más restos de aminoácidos de los dominios de la región constante se sustituyen o eliminan. Un ejemplo sería introducir sustituciones de aminoácidos en la región CH2 superior para crear una variante de Fc con afinidad reducida por los receptores de Fc (Cole y col. (1997) J. Immunol. 159: 3613). Una persona normalmente experta en la técnica puede preparar dichas construcciones utilizando técnicas de biología molecular bien conocidas.

10 Los ejemplos no limitantes de fármacos de proteína capaces de conjugarse con el fragmento Fc de la inmunoglobulina de la presente invención incluyen la hormona del crecimiento humano, la proteína-1 morfogenética del hueso (BMP-1), hormona liberadora de la hormona de crecimiento, péptido liberador de la hormona del crecimiento, interferones y receptores de interferones (por ejemplo, interferón α , β y γ , receptor del interferón de tipo I soluble en agua, etc.), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), péptidos de tipo glucagón (por ejemplo, GLP-1, etc.), receptor acoplado a la proteína G, interleucinas (por ejemplo, interleucina 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, etc.) y los receptores de las interleucinas (por ejemplo, receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, agalsidasa alfa y beta, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleucina y citocina (por ejemplo, IL-18pb, proteína de unión a TNF, etc.), factor activador de macrófagos, péptido de macrófago, factor de linfocitos B, factor de linfocitos T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento metastásico, antitripsina alfa-1, albúmina, alfa-lactoalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina muy glicosilada, angiopoyetinas; hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de la trombina, trombosmodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activador del plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de la renina, inhibidor de la colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento del hueso, proteína estimuladora ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador del tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona estimuladora del folículo, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor 1 de la axogénesis, péptido natriurético del cerebro, factor neurotrófico derivado glial, netrina, factor inhibidor neurófilo, factor neurotrófico, neurturina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento de tipo insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de la gastrina, factor de liberación de la corticotropina, hormona estimuladora del tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo, TNFR(P75), TNFR(P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor del factor activador de linfocitos B, etc.), antagonistas de receptores (por ejemplo, IL1-Ra, etc.), antígenos superficiales celulares (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), antígenos de vacunas de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus. Un fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab', F(ab')₂, Fd o scFv, que es capaz de unirse a un antígeno específico, y preferiblemente Fab'. Los fragmentos Fab contienen el dominio variable (VL) y el dominio constante (CL) de la cadena ligera y el dominio variable (VH) y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en términos de añadir algunos restos de aminoácidos que incluyen uno o más restos de cisteína procedentes de la región bisagra al extremo carboxilo del dominio CH1. Los fragmentos Fd comprenden solo el dominio VH y CH1, y los fragmentos F(ab')₂ se producen como una pareja de fragmentos Fab' bien mediante enlace disulfuro o mediante reacción química. Los fragmentos scFv (Fv monocatenarios) comprenden los dominios VL y VH que se unen entre sí mediante un engarce peptídico y de esta manera están presentes en una cadena de un único polipéptido.

50 En particular, se prefieren como moléculas biológicamente activas aquellas que requieren una frecuente dosificación tras la administración en el cuerpo para la terapia o la prevención de enfermedades, que incluyen la hormona del crecimiento humano, interferones (interferón α , β , γ , etc.), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO), receptor de TNF, p40 y fragmentos de anticuerpos. Además, se incluyen determinados derivados en el alcance de las moléculas biológicamente activas de la presente invención siempre que tengan función, estructura, actividad o estabilidad sustancialmente idéntica a o mejorada en comparación con otras formas naturales de las moléculas biológicamente activas. En la presente invención, el fármaco de polipéptido más preferible es el interferón alfa.

60 En otro aspecto de la invención, las proteínas de fusión IgG-Fc e IgG-CH, por ejemplo, se sintetizan como monómeros que pueden ensamblarse para formar dímeros. Normalmente, los dímeros se unen mediante enlaces disulfuro en la región bisagra de la IgG. Los medios acondicionados procedentes de células que secretan las proteínas de fusión de IgG pueden contener mezclas de monómeros y dímeros de la proteína de fusión de IgG. Para su uso como agentes terapéuticos humanos, será deseable utilizar poblaciones homogéneas tanto de monómeros como de dímeros de la proteína de fusión de IgG, pero no de las mezclas de las dos formas.

Se proporcionan también procedimientos para obtener preparaciones esencialmente puras de proteínas de fusión de IgG-polipéptido dimérico activo. Los procedimientos se llevan a cabo generalmente obteniendo una célula huésped capaz de expresar la proteína de fusión de IgG, recogiendo los medios acondicionados y purificando la proteína de fusión dimérica a partir de la proteína de fusión monomérica, los agregados y las proteínas contaminantes mediante procedimientos de cromatografía en columna. Las células huéspedes adecuadas para expresar las proteínas de fusión de IgG incluyen células de levaduras, insectos, mamíferos u otras células eucariotas. En una realización, la célula huésped puede ser una célula de mamífero, particularmente células COS; CHO o BHK.

Se proporcionan también proteínas de fusión novedosas de un fármaco de polipéptido y un fragmento Fc. En una realización, un fármaco de polipéptido tal como EPO, p40, G-CSF o el receptor de TNF se une directamente al fragmento Fc híbrido sin intervención de un engarce peptídico. En otra realización, el fármaco de polipéptido se une a cada uno de los otros mediante un engarce peptídico de 1 a 50 aminoácidos, y, de forma más preferible, mediante un engarce peptídico de 1 a 7 aminoácidos. Los engarces particularmente útiles para este fin incluyen un péptido inmunológicamente inactivo compuesto por restos de Gly y Ser (por ejemplo, Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser SEQ ID NO: 32) o compuesto por aminoácidos en las posiciones 282-314 de la SEQ ID NO: 25, derivada de albúmina humana.

En el caso en que se utiliza un engarce, el engarce y el fármaco de polipéptido pueden prepararse en una determinada dirección. Esto es, el engarce puede unirse en el extremo N, el extremo C o un grupo libre del fragmento Fc híbrido, y puede también unirse en el extremo N, el extremo C o un grupo libre del fármaco de polipéptido. Cuando el engarce es un engarce peptídico, el enlace puede tener lugar en un sitio de unión determinado. Cuando un fármaco de polipéptido y un Fc híbrido se expresan de forma separada y a continuación se unen entre sí, el acoplamiento se puede llevar a cabo usando cualquiera de varios agentes de acoplamiento conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de los agentes de acoplamiento incluyen 1,1-bis (diazacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida tales como ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (propionato de succinimidilo), y maleimidias funcionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano.

La presente invención proporciona también procedimientos para la producción de un fragmento Fc-híbrido-fármaco de polipéptido.

La presente invención proporciona también procedimientos para tratar afecciones aliviadas mediante la administración de un fármaco de polipéptido. Estos procedimientos incluyen administrar a un mamífero que tiene la afección, que puede estar o no directamente relacionada con la enfermedad de interés, una cantidad eficaz de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, se puede administrar a un sujeto, preferentemente un mamífero, un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN, que codifica una proteína de fusión de un fragmento Fc híbrido-fármaco de polipéptido deseado, como agente terapéutico. Adicionalmente, se puede administrar a un sujeto, preferentemente un mamífero, una célula que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de fragmento Fc híbrido-fármaco de polipéptido, como agente terapéutico. Además, se puede administrar a un sujeto, preferentemente un mamífero, una construcción de fusión de fragmento Fc híbrido-fármaco de polipéptido, como agente terapéutico. Dicho polipéptido quimérico puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea, oral, bucal, sublingual, nasal, parenteral, rectal, vaginal o por una vía pulmonar.

Una proteína de fusión de EPO (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil para aumentar y mantener el hematocrito en un mamífero.

p40 es una subunidad de IL-12. IL-12 es una citocina heterodimérica de 75 kDa que tiene algunas funciones *in vivo*. Por ejemplo, IL-12 estimula la proliferación de linfocitos T y NK activados y promueve las respuestas del linfocito auxiliar de tipo Th1. IL-12 ejerce sus efectos biológicos mediante la unión del receptor de IL-12 a la membrana plasmática de los linfocitos T y NK activados, y la capacidad de IL-12 de unirse al receptor de IL-12 se ha atribuido a la subunidad p40 de IL-12. Por tanto, una proteína de fusión de p40 (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil para reducir los síntomas de/evitar/tratar una enfermedad autoinmune, (□) inhibir el rechazo de un injerto, o (□) tratar/evitar el choque inducido por una endotoxina. También una proteína de fusión de p40 (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil en el tratamiento/prevención/mejora de los síntomas de la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple o psoriasis. Se conocen en la técnica variantes y fragmentos, incluyendo, pero sin limitarse a, el documento WO 97/20062, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia. Una realización de la variante p40 incluye, pero no se limita a, p40 que contiene la sustitución Asn303Gln.

El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) es una proteína que es esencial para la proliferación y diferenciación de los granulocitos, particularmente los neutrófilos. Los granulocitos engullen y devoran invasores microbianos y desechos celulares y de esta manera son cruciales para la respuesta a la infección. La quimioterapia destruye los granulocitos y/o disminuye la producción de granulocitos. Por tanto, una proteína de fusión G-CSF (incluyendo sus variantes/fragmentos)-fc de la presente invención puede ser útil en el tratamiento/prevención/mejora de los síntomas de la mielosupresión de la neutropenia inducida por quimioterapia tras el trasplante de médula ósea, leucemia aguda, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, neutropenias crónicas graves, o movilización de las

células progenitoras de la sangre periférica para el trasplante.

Las proteínas de fusión de la invención no solo son útiles como agentes terapéuticos, sino que un experto en la técnica reconoce que las proteínas de fusión son útiles en la producción de anticuerpos para uso diagnóstico. Igualmente, la administración adecuada del ADN o ARN, por ejemplo, en un vector u otro sistema de administración para dichos usos, está incluida en los procedimientos de uso de la invención.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier ruta que sea compatible con las moléculas concretas. Se contempla que las composiciones de la presente invención se pueden proporcionar a un animal mediante cualquier medio adecuado, en forma directa (por ejemplo, por vía local, como mediante inyección, implante o administración tópica a un locus en un tejido) o por vía sistémica (por ejemplo, por vía parenteral u oral). Cuando la composición es para proporcionar por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, subcutánea, oftálmica, intraperitoneal, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intranasal o mediante administración en aerosol, la composición incluye preferiblemente parte de una suspensión o disolución fluida acuosa o fisiológicamente compatible. De esta manera, el portador o vehículo es fisiológicamente aceptable de tal manera que, además de administrar la composición deseada al paciente, no afecta de forma adversa de otra forma al electrolito y/o al equilibrio volumétrico del paciente. El medio fluido para el agente puede incluir de esta manera solución salina fisiológica normal.

Las construcciones de ADN (o construcciones génicas) de la invención se pueden usar también como parte de un protocolo de terapia génica para administrar los ácidos nucleicos que codifican un fármaco de polipéptido o una construcción de una proteína de fusión del mismo.

La invención se caracteriza por vectores de expresión para la transfección y la expresión *in vivo* de un fármaco de polipéptido de interés o una construcción de una proteína de fusión del mismo en tipos de células concretos con el fin de reconstruir o suplementar la función del fármaco de polipéptido deseado. Se pueden administrar construcciones de expresión del fármaco de polipéptido deseado, o construcciones de la proteína de fusión del mismo, en cualquier vehículo biológicamente eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de administrar eficazmente el gen que codifica el fármaco de polipéptido deseado o la construcción de la proteína de fusión del mismo a las células *in vivo*.

Los enfoques incluyen la inserción del gen sujeto en vectores víricos que incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, y el virus 1 del herpes simple recombinantes, o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Las dosificaciones preferidas para la administración de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de la invención están comprendidas en el intervalo de 0,1 mg – 100 mg para seres humanos, de forma más preferible 1 mg – 10 mg, y lo más preferible 2 mg - 10 mg. Se contempla que la dosificación óptima y el modo de administración se pueden determinar mediante experimentación rutinaria bien comprendida en los conocimientos del experto en la técnica.

Las dosificaciones preferidas de la proteína de fusión por administración están comprendidas en el intervalo de 0,1 mg – 1.000 mg para seres humanos, de forma más preferible, 1 mg -100 mg, y lo más preferible 5 mg – 20 mg. Se contempla que la dosificación óptima, sin embargo, dependa también de la enfermedad que se está tratando y de la existencia de efectos secundarios. Sin embargo, se pueden determinar las dosificaciones óptimas utilizando experimentación rutinaria. La administración de la proteína puede ser mediante inyecciones en bolo periódicas, o mediante administración intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal continua desde un depósito externo (por ejemplo, desde una bolsa intravenosa) o interna (por ejemplo, a partir de un implante bioerosionable).

Además, se contempla que las proteínas de fusión de la invención se pueden administrar también al receptor previsto junto con una pluralidad de diferentes moléculas biológicamente activas. Se contempla, sin embargo, que la combinación óptima de la proteína de fusión y otras moléculas, modos de administración y dosificaciones se puede determinar mediante experimentación rutinaria bien comprendida dentro del nivel de conocimientos del experto en la técnica.

Modo para realizar la invención

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitantes

<Ejemplo 1> Preparación de vectores de expresión para las proteínas de fusión hFc-1, hFc-2, hFc-3, hFc-4, hFc-5 y hFc-6

La hFc-1 incluye 9 aminoácidos (90-98) de la región CH1 de la IgG del extremo C, la región bisagra (99-113) de IgG1, 6 aminoácidos (111-116) de la región CH2 de la IgG2 del extremo N, 103 aminoácidos (118-220) de la región CH2 de la IgG4, y 107 aminoácidos (221-327) de la región CH3 de la IgG4 (Fig. 1 y 2). Se muestra en la SEQ ID NO: 18 una secuencia de aminoácidos de la hFc-1, Para obtener nucleótidos con codones optimizados que codifican, cada uno de ellos, la hFc-1 (SEQ ID NO:1), la EPO humana (SEQ ID NO: 7), el G-CSF humano (SEQ ID NO: 8) y la p40N303Q humana (un mutante derivado de la sustitución de Asn con Gln en el 303^{er} aminoácido de la subunidad p40 humana) (se muestra una secuencia de nucleótidos de p40N303Q como la SEQ ID NO:9, y se

muestra una secuencia de aminoácidos de la p40 humana como la SEQ ID NO: 17), respectivamente, estas moléculas de nucleótidos se sintetizaron mediante un servicio personalizado de TOP Gene Technologies (Quebec, Canadá) (www.topgenetech.com). Para aumentar el nivel de expresión de la proteína, resulta de mucha utilidad optimizar el uso codónico del gen. El patrón de uso codónico difiere entre organismos. Algunos codones se utilizan con más frecuencia en un organismo, pero se usan raramente en otro organismo. El sesgo en el uso codónico se ha atribuido a la eficacia de la traducción, la capacidad del organismo para sintetizar la proteína codificada. Para insertar cada gen de fusión en un vector de expresión, pAD11 (SEQ ID NO: 10), se generó un sitio EcoRI en el extremo 5' de la secuencia ATG de la EPO, G-CSF, y p40N303Q y se generó un sitio Xba I en el extremo 3' del codón de terminación de hFc-1. El vector de expresión pAD 11 se obtuvo de la cadena principal de RcCMV (disponible de Invitrogen, Carlsbad). pAD11 incluye un promotor derivado de citomegalovirus (CMV), secuencias poli (A) derivadas de la hormona de crecimiento bovino, secuencia intermedia de la globina (gIVS) derivada de la beta globina de conejo (Mol Cell Biol, 1988 8: 4395) etc. Para preparar el vector pAD11, existen algunas modificaciones a partir del vector RcCMV (Invitrogen). Se eliminó una región resistente a la neomicina mediante tratamiento con la enzima Xho I y se añadió gIVS a 3' de la región del promotor de CMV. Además, se añadió un gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (DHFR, Pubmed, NM 010049) a 5' del promotor de CMV. El vector pAD11 se desarrolló después de muchas pruebas de expresión en combinación con algunos elementos incluyendo los descritos anteriormente. En el resultado no publicado de los autores, el vector pAD11 mostró un aumento de aproximadamente 12 veces en el nivel de expresión, en comparación con el vector RcCMV (Invitrogen). Para preparar un sitio de unión entre el extremo 3' de EPO, G-CSF y p40N303Q y el extremo 5' de hFc-1 en fase, se generó un sitio Nhe I en el extremo 3' de la secuencia codificante de EPO, G-CSF y p40N303Q y en el extremo 5' de la secuencia codificante de hFc-1. Tras subclonar mediante cada uno de los sitios de las enzimas de restricción, se generaron los vectores de expresión finales de la hFc-1 fusionada con EFO, G-CSF o p40N303Q, y se designaron posteriormente pAD11 EPO-hFc-1, pAD11 G-CSF-hFc-1 y pAD11 p40N303Q-hFc-1, respectivamente.

Se muestran las secuencias de los aminoácidos de hFc-2, hFc-3, hFc-4, hFc-5 y hFc-6 en las SEQ ID NO: 19-23, respectivamente. La hFc-6 incluye 9 aminoácidos (90-98) del dominio CH1 de la IgD del extremo C, 64 aminoácidos de la región bisagra (99-162) de IgD, 8 aminoácidos (shtqplgv 163-170) del dominio CH2 de la IgD del extremo N, 100 aminoácidos (121-220) del dominio CH2 de la IgG4, y 107 aminoácidos (221-327) del dominio CH3 de la IgG4 (Fig. 1 y 2). Para obtener moléculas de nucleótidos con codones optimizados que codifiquen la hfc-6 (SEQ ID NO: 6, se sintetizó el gen mediante el servicio personalizado de TOP Gene Technologies (www.topgenetech.com). Para hacer una fusión entre el extremo 3' de EPO, G-CSF, o p40N303Q y el extremo 5' de hFc-6 en fase, se usó un sitio Nhe I (gctagc: Ala-Ser) incluido en la región codificante del extremo N (90 y 91 aminoácidos) de hFc-6. También, para insertar cada gen de la fusión hFc-6 en un vector pAD 11, se generó un sitio Xba I en el extremo 3' del gen hFc-6. Tras subclonar utilizando cada sitio de las enzimas de restricción, se generaron los vectores de expresión final de la EPO fusionada con hFc-6, G-CSF y p40N303Q, y se designaron a continuación pAD11 EPD-hFc-6, pAD11 G-CSF-hFc-6 y pAD11 p40N303QhFc-6, respectivamente. Las hFc-2, hFc-3, hFc-4 y hFc-5 tienen regiones CH2 y CH3 idénticas, pero tienen diferentes tamaños de la bisagra de IgD (Figs. 1 y 2). La hFc-2 (SEQ ID NO: 19), hFc-3 (SEQ ID NO: 20), hFc-4 (SEQ ID NO: 21) y hFc-5 (SEQ ID NO: 22) incluye 5 aminoácidos (158-162), 10 aminoácidos (153-162), 20 aminoácidos (143-162), 30 aminoácidos (133-162) de la bisagra de la IgD del extremo C, respectivamente (Fig. 1 y 2). Para llevar a cabo la fusión de los genes entre EPO, G-CSF, p40N303Q o TNFR (receptor II del factor de necrosis tumoral) (SEQ ID NO: 30) y las moléculas de ácido nucleico que codifican estas hFc (SEQ ID NO: 2-5), se sintetizaron los fragmentos génicos mínimos en el tamaño total de los genes fusionados mediante el servicio personalizado de TOP Gene Technologies (www.topgenetech.com). Los fragmentos sintetizados de cada EPO, G-CSF, p40N303Q o TNFR fusionados con una molécula de nucleótido que codifica la bisagra y la región CH2 del extremo N de cada hFc-2, hFc-3, hFc-4 o hFc-5 incluyen las secuencias incluidas entre las secuencias completas de EPO, G-CSF, p40N303Q o TNFR y el sitio idéntico de la enzima, el sitio BstE II (GGTGACC) que está localizado en los restos de aminoácidos 138-140° de la región CH2 en IgG4 (SEQ ID NO: 13). Los vectores de subclonación incluyendo algunos fragmentos génicos se cortaron con EcoR I y BstE II localizados en el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente, y a continuación se unieron a la región CH2-CH3 de la hFc-6. Finalmente, cada gen de fusión se subclonó en el pAD11 utilizando los sitios EcoR I y Xba I, y a continuación se designaron pAD11 EPO-hFc-2, pAD11 EPO-hFc-3, pAD11 EPO-hFc-4, pAD11 EPO-hFc-5, pAD11 G-CSF-hFc-2, pAD11 G-CSF-hFc-3, pAD11 G-CSF-hFc-4, pAD11 G-CSF-hFc-5, pAD11 p40N303Q-hFc-2, pAD11 p40N303Q-hFc-3, pAD11 p40N303Q-hFc-4, pAD11 p40N303Q-hFc-5 y pAD11 TNFR-hFc-5, respectivamente.

<Ejemplo 2> preparación de los vectores de expresión de thFc-1 y thFc-2 acoplados a IFN- β

La thFc-1 incluye 23 aminoácidos (MDAMLRGLCCVLLLCGAVFVSPS) de la secuencia señal del activador del plasminógeno del tejido humano (tPA), 15 aminoácidos (99-113) de la región bisagra de IgG1, 6 aminoácidos (111-116) de la región CH2 de la IgG2 del extremo N, 103 aminoácidos (118-220) de la región CH2 de IgG4, y 107 aminoácidos (221-327) de la región CH3 de IgG4 (Fig. 3). Se muestra una secuencia de aminoácidos de thFc-1 en la SEQ ID NO: 28. La thFc-2 incluye 23 aminoácidos (MDAMLRGLCCVLLLCGAVFVSPS) de la secuencia señal de tPA, 15 aminoácidos (148-162) de la región bisagra de la IgD, 8 aminoácidos (163-170) de la región CH2 de la IgD del extremo N, 100 aminoácidos (121-220) de la región CH2 de la IgG4, y 107 aminoácidos (221-327) de la región CH3 de la IgG4 (Fig. 3). Se muestra una secuencia de aminoácidos de thFc-2 en la SEQ ID NO: 29. Para obtener los nucleótidos de codones optimizados que codifican thFc-1 (SEQ ID NO: 26) o thFc-2 (SEQ ID NO: 27) acoplados al extremo N del IFN-beta humano con la secuencia señal eliminada, se sintetizaron estas moléculas de nucleótidos

mediante el servicio personalizado de TOP Gene Technologies (Quebec, Canadá) (www.topenetech.com). Para insertar cada gen de fusión en un vector de expresión, pAD11 (SEQ ID NO: 10), se generó un sitio EcoR I en el extremo 5' de thFc-1 o thFc-2 y se generó un sitio Not I en el extremo 3' del codón de terminación de IFN-beta. Tras subclonar utilizando cada sitio de las enzimas de restricción, se designaron los vectores de expresión final pAD11 thFc-1-AL(0)-IFN-beta y pAD11 thFc-2-AL(0)-IFN-beta, respectivamente.

Para acoplar thFc a IFN-beta mediante engarces de albúmina de diferentes tamaños o el engarce Gly-Ser, los fragmentos génicos que abarcan desde el sitio Pst I de la región CH3 de thFc-1 acoplado a IFN-beta cuya secuencia señal se había eliminado mediante engarces de albúmina de diferentes tamaños (3aa, 8aa, 13aa, 18aa, 23aa y 33aa) o el engarce Gly-Ser, fueron sintetizados por el servicio personalizado de TOP Gene Technologies (www.topgenetech.com) (Fig. 4). Para insertar 7 diferentes fragmentos génicos en los vectores de expresión, pAD11 thFc-1-AL(0)-IFN-beta y pAD11 thFc-2-AL(0)-IFN-beta, se generó un sitio Pst I en el extremo 5 de los mismos y se generó un sitio Not I en el extremo 3 del codón de terminación de IFN-beta. Tras subclonar utilizando cada sitio de las enzimas de restricción, se designaron los vectores de expresión final pAD11 thFc-1-AL(1)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(2)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(3)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(4)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(5)-IFN-beta, pAD11 thFc-1-AL(6)-IFN-beta pAD11, thFc-1-GS-IFN-beta, y pAD11 thFc-2-AL(1)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(2)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(3)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(4)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(5)-IFN-beta, pAD11 thFc-2-AL(6)-IFN-beta pAD11 y thFc-2-GS-IFN-beta.

<Ejemplo 3> Expresión de las proteínas EPO-hFc humanas, G-CSF-hFc humanas, p40N303Q-hFc humanas, TNFR-hFc-5 y thFc-IFN-beta humanas

Se usaron células COS-7 para el ensayo de la expresión y se cultivaron con medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Hyclone, South Logan) y antibióticos (Invitrogen, Carlsbad). Se transfectaron los vectores que codificaban EPO-hFc, G-CSF-hFc, p40N303Q-hFc, TNFR-hFc-5, thFc-IFN-beta en 5 X 10⁶ células COS-7 utilizando procedimientos de electroporación convencionales. A las 48 h de la transfección, se cosecharon los sobrenadantes y las células. Para comprobar la expresión de la proteína de fusión de cada vector, se utilizaron todas las muestras para el ensayo ELISA con varios Kits (R&D system, Minneapolis, n° DEP00 para EPO; Biosource, Camarillo, n° KHC2032, para G-CSF; R&D system, Minneapolis, n° DY1240 para p40N303Q de R&D System, Minneapolis, n° DRT200 para TNFR, PBL Biomedical Laboratories, n° 41410-1A para IFN-beta) y el análisis de la transferencia de western con anticuerpos dirigidos contra la IgG humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz). Como resultado, todos los vectores mostraron un patrón correcto de expresión en los sobrenadantes y los lisados celulares (no se muestran los datos)

<Ejemplo 4> Purificación de proteínas fusionadas con hFc

Se cultivaron células CHO/DHFR^{-/-} (células de ovario de hámster chino, DG44, ATCC) con α -MEM (Invitrogen, Carlsbad), suero bovino fetal dializado al 10 % (JRH Biosciences, Kansas), suplemento de HT (Invitrogen, Carlsbad) y antibióticos (Invitrogen, Carlsbad). Los vectores de expresión se transfectaron a células CHO de acuerdo con los procedimientos de precipitación simultánea de CaPO₄ convencionales. A las 48 h de la transfección, las células CHO se desprendieron de las placas y se diluyeron varias veces (1/2, 1/5, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500). Las células diluidas se sembraron en placas de 100 mm y se cultivaron con los medios sin el complemento de HT. Durante el procedimiento de cribado, se suministraron medios recientes sin el suplemento de HT a las células sin pases. Se generaron colonias durante 2-3 semanas después de la siembra y se movieron las colonias individuales a placas de 48 pocillos. Se cribaron las colonias positivas tras el ensayo ELISA para las detecciones de la EPO, G-CSF, p40N303Q y TNFR. Cada colonia que mostró la expresión más elevada se cultivó a gran escala (5 l) usando medio sin suero (JRH Biosciences, Kansas). Los sobrenadantes sin suero cosechados se usaron para la purificación de cada proteína de fusión. Para la purificación, columnas FF de proteína A recombinante de HiTrap (Amersham Biosciences, Piscataway) se equilibraron con fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0). Se añadieron los sobrenadantes filtrados a las columnas y se eluyeron con citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0). Se obtuvieron finalmente las proteínas eluidas tras diálisis con membrana (PCPM 12 14K, Spectrapor, Rancho Dominguez) más de tres veces. Se determinaron todas las concentraciones de las muestras de proteínas mediante el kit BCA (Pierce Biotechnology, Rockford) para la medida de la proteína total y mediante kits ELISA para la medida de las EFO-hFc, G-CSF-hFc, p40N303Q-hFcs, TNFR-hFc-5 y thFc-IFN-beta.

<Ejemplo 5> Ensayo de unión a FcgRI y C1q

Para investigar si las proteínas fusionadas a hFc-5 se unen a FcgRI y C1q, Mabthera (Rituximab, Roche), hlgG1 (Calbiochem, n° de Cat. 400120), Enbrel® (etanercept, Amgen), EPO-hFc-5, G-CSF-hFc-5 y p40N303Q-hFc-5 se diluyeron en serie (de 2 μ g/ml a 16 ng/ml en 2 veces) y se usaron para revestir una tira de 8 pocillos (COSTAR, Nueva York) durante la noche en 4. Para preparar una curva patrón, se diluyeron en serie también FcgRI (R&D, n° de Cat BAF1257) o C1q (AbD serotech, n° de Cat 2221-5504) (de 2 μ g/ml a 32 ng/ml en 2 veces) y se usaron para revestir una tira de 8 pocillos (COSTAR, Nueva York) durante la noche en 4. Tras lavar cada tira de muestras con tampón de lavado (PBS que contenía Tween al 0,05 %) y bloquear con FBS al 10 % en PBS durante una hora a TA, se añadieron FcgRI o C1q en cada pocillo a 2 μ g/ml tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente (TA). Se lavaron todas las tiras con tampón de lavado. Para el ensayo de unión a C1q, se añadió un anticuerpo dirigido contra C1q conjugado con HRP (AbD serotech, n° de cat. 2221-5004P) en cada pocillo a 2,5 μ g/ml después de 30 min de

incubación a TA en condiciones de oscuridad. Para el ensayo de unión a FcgRI, se añadió un anticuerpo biotinilado dirigido contra FcgRI (R&D, nº de cat. 1257-FC) en cada pocillo a 2 µg/ml tras 1 hora de incubación a TA. Tras lavarlos con tampón de lavado, se añadió Estreptavidina-HRP (BD, nº de cat. 554066) diluida 3.000 veces a cada tira tras una incubación de 30 minutos a TA en condiciones de oscuridad. Tras el lavado de las tiras, se añadió solución de TMB (mezcla 1:1 de sustrato de peroxidasa TMB y solución B de sustrato de peroxidasa, KPL, nº de Cat. 50-76-01, nº de Cat. 50-65-00) para el revelado y se añadió H₂SO₄ 2 N para detener el revelado. Tal como se muestra en la Fig. 6(a) y en la Fig. 6(b), MabThera® Enbrel® e hlgG1 mostraron una buena unión a FcgRI y C1q, pero EPO-hFc-5, G-CSF-hFc-5 y p40N303Q-hFc-5 no.

<Ejemplo 6> Bioactividad *in vitro* de proteínas fusionadas a hFc purificadas

10 Para investigar las bioactividades *in vitro* de las proteínas EPO-hFc, se cultivó la línea celular F35E humana en medio RPMI1640 (Cambrex, Charles City) complementado con FBS al 10 %, antibióticos y 5 UI/ml de EPO humana recombinante (DongA, República de Corea). Se prepararon los bioensayos sembrando 2 X 10⁴ células en los pocillos de ensayo de una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning, Países Bajos). Se añadieron las muestras con diluciones en serie (0, 0,064 mUI/ml a 25 UI/ml en 5 veces) de EPO, EPO-hFc-1, EPO-hFc-5, EPO-hFc-6, EPO-IgG1 Fc o Aranesp (darbepoetina alfa, Amgen), a estos pocillos y se incubaron las placas a 37 °C durante 72 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. De acuerdo con el protocolo del fabricante, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich, Corea). La línea celular F35E humana mostró una fuerte respuesta proliferativa a rEPO, tal como se demostró de una manera dependiente de la dosis en el número de células y los valores de absorbancia. Tal como se muestra en la Fig. 7(a), Aranesp® y las proteínas EPO acopladas a IgG1 Fc o las hFc mostraron pérdida de actividad biológica en comparación con la proteína EPO. Sin embargo, EPO-hFc-1, EPO-hFc-5 y EPO-hFc-6 mostraron una bioactividad significativamente mayor que EPO-IgG1 Fc. Además, EPO-hFc-5 y EPO-hFc-6 mostraron una bioactividad ligeramente mayor que Aranesp® indicando que estas proteínas fusionadas a hFc parecen ser mejores que Aranesp® en términos de mantener la bioactividad de la proteína EPO.

25 Para investigar las bioactividades *in vitro* de la proteína G-CSF-hFc, se cultivó una línea celular hematopoyética de ratón, NFS-60 en medio RPMI1640 (Cambrex, Charles City) complementado con FBS al 10 %, antibióticos, y 100 unidades/ml de IL-3 recombinante de ratón (R&D system, Minneapolis). Se prepararon los bioensayos sembrando 2 X 10⁴ células en los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning, Países Bajos). Las muestras con diluciones en serie (que variaban desde 0 a 10.000 pg/ml en 3 veces) de G-CSF-hFc-5 y Neulasta (pegfilgrastim, Amgen) se añadieron a estos pocillos y se incubaron las placas a 37 °C durante 72 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Se evaluaron las muestras de proteína en pocillos por triplicado y este experimento se llevó a cabo repetidamente durante cinco veces. A las 72 horas de la incubación, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich, Corea), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tal como se ilustra en la Fig. 7(b), G-CSF-hFc-5 mostró una bioactividad ligeramente superior *in vitro* que Neulasta®.

Para investigar la bioactividad *in vitro* de la proteína p40N303Q-hFc, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con artritis reumatoide con 2 µg/ml de anticuerpo dirigido contra CD3 humana (R&D system, nº MAB 100) con o sin 10 ng/ml de p40 humana (R&D system) o p40N303Q-hFc-5 en medio RPMI1640 (Cambrex, Charles City) complementado con FBS al 10 %, y antibióticos. Después del día 6, se midieron las células positivas para CD4 e IL-17 mediante el análisis FACS. Tal como se muestra en la Fig. 7(c), p40N303Q-hFc-5 mostró un efecto supresor más fuerte sobre la generación de células CD4⁺ / IL-17⁺ que la proteína p40, indicando la función inhibidora de p40N303Q-hFc-5 sobre la polarización de Th17.

45 Para investigar la bioactividad *in vitro* de la proteína TNFR-hFc, se cultivaron células L929 de murino en medio RPMI1640 (Cambrex, Charles City) complementado con FBS al 10 % y antibióticos. Se preparó el ensayo de inhibición citopática sembrando 3 X 10⁴ células en los pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Países Bajos), a continuación se trataron con 1 ng/ml de TNF-α. Las muestras con las diluciones en serie (que variaban desde 15,6 a 1.000 ng/ml en 2 veces) de TNFR-hFc-5 y Enbrel® (etanercept, Amgen) se añadieron a estos pocillos y se incubaron las placas a 37 °C durante 48 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Tras la incubación, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich., Corea), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tal como se ilustra en la Fig. 7(d), TNFR-hFc-5 mostró una bioactividad *in vitro* ligeramente mayor que Enbrel®.

55 Para investigar las bioactividades *in vitro* de las proteínas thFc-1-AL(0)-IFN-β y thFc-1-AL(3)-IFN-β, se cultivaron células WISH (ATCC, CCL-25) en DMEM F12 (Cambrex, Charles City) complementado con FBS al 10 % y antibióticos. Se preparó el ensayo de inhibición citopática sembrando 3 X 10⁴ células en los pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Países Bajos), a continuación se trataron con 1.500 UFP/pocillo de VSV (ATCC, VR-158). Las muestras con diluciones en serie (de 40 UI/ml en 2 veces) de las proteínas de IFN-β recombinante (Norma WHO, NIBSC 00/572), thFc-1-AL(0)-IFN-β y thFc-1-AL(3)-IFN-β se añadieron a estos pocillos y se incubaron las placas a 37 °C durante 48 horas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Tras la incubación, se llevó a cabo el ensayo MTT utilizando un kit de ensayo colorimétrico de crecimiento celular (Sigma-Aldrich, Corea), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tal como se ilustra en la Fig. 7(e), thFc-1-AL(3)-IFN-β mostró una bioactividad *in vitro* aproximadamente 20 veces mayor que thFc-1-AL(0)-IFN-β, indicando el

importante papel del engarce de la albúmina en el mantenimiento de la bioactividad del IFN-beta fusionado a Fc.

<Ejemplo 7> Semivida *in vivo* de las proteínas fusionadas con hFc purificadas

Para comparar la semivida de EPO-hFc-1, EPO-hFc-5 y Aranesp, se trataron cinco monos cynomolgus con estas proteínas en una dosis de 2.400 UI/kg mediante una única inyección subcutánea (SC) o una única inyección intravenosa (IV). Se obtuvieron muestras de sangre de cada mono antes de la inyección y a 1, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96, 120, 168, 336, 504 y 672 h después de la inyección. Las muestras de sangre se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min hasta coagularse. Después de una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, se obtuvieron sueros de cada muestra y se almacenaron en un congelador. Todas las muestras obtenidas en cada punto se ensayaron para la cuantificación de EPO mediante el kit EPO ELISA (R&D, n° de cat. DEP00). Tal como se muestra en la Fig. 8(a), todos los monos individuales inyectados con EPO-hFc-1 o EFO-hFc-5 mediante las rutas SC o IV mostraron una semivida más larga que los monos individuales inyectados con Aranesp® mediante las rutas SC o IV.

Para investigar la farmacocinética de G-CSF-hFc-1, se administraron 100 µg/kg de LEUCOSTIM® filgrastim, DongA, República de Corea) y G-CSF-hFc-1 mediante las rutas SC o IV a dos ratas Sprague Dawley macho (Charles River Laboratories, Wilmington) por grupo. Se extrajo sangre antes de la inyección y 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 192 h después de la inyección. Se obtuvieron los sueros por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min tras incubación a temperatura ambiente durante 30 min y se almacenaron en un congelador. Se cuantificaron las muestras con varios factores de dilución tales como 1/2, 1/5, 1/50, 1/250, 1/500 utilizando el kit G-CSF (Biosource, Camarillo, n° KHC2032). Tal como se muestra en la Fig 8(b) G-CSF-hFc-1 inyectada mediante las rutas SC o IV mostró una semivida más larga que LEUCOSTIM® G-CSF-hFc-1 y G-CSF tuvieron 8,76 h y 2,36 h de $t_{1/2}$ *in vivo* tras la administración de SC y 10,42 h y 1,78 h tras la administración IV, respectivamente. Por tanto, G-CSF-hFc-1 mostró un aumento de 3,7 veces tras las inyecciones SC y de 5,9 veces tras la inyección IV, en comparación con LEUCOSTIM®.

Para investigar la farmacocinética de p40N303Q-hFc-5 y Enbrel®, se trataron tres monos cynomolgus por grupo con una única inyección SC en una dosis de 100 µg/kg. Se obtuvieron las muestras de sangre de cada mono antes de la inyección y a 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 336, 504 y 672 h después de la inyección. Se incubaron las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 30 min hasta que se coagularon. Después de una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min, se obtuvieron sueros de cada muestra y se almacenaron en un congelador. Todas las muestras obtenidas en cada punto se ensayaron para la cuantificación de la p40 humana y TNFR II humano mediante los kits ELISA (R&D system, Minneapolis, n° DY1240 y n° DRT200, respectivamente). Tal como se muestra en la Fig. 8(c), p40N303Q-hFc-5 mostró una semivida más larga que el promedio de Enbrel® de 199 h frente a 127 h), aunque p40N303Q-hFc-5 mostró un valor $C_{máx}$ menor que Enbrel® (promedio de 3 ng/ml frente a 7 ng/ml).

Para investigar la farmacocinética de TNFR-hFc-5 y Enbrel, se trataron tres ratas Sprague Dawley macho (Charles River Laboratories, Wilmington) por grupo con una única inyección SC en una dosis de 500 µg/kg. Se obtuvieron muestras de sangre de cada rata antes de la inyección y a 2, 4, 8, 12, 24, 30, 48, 72 y 120 h después de la inyección. Se incubaron las muestras de sangre a temperatura ambiente durante 30 min hasta que se coagularon. Después de la centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min, se obtuvieron sueros de cada muestra y se almacenaron en un congelador. Se ensayaron todas las muestras obtenidas en cada punto para la cuantificación de TNFR II humano mediante kits ELISA (R&D system, Minneapolis, n° DRT200). Tal como se muestra en la Fig. 8(d), TNFR-hFc-5 mostró un nivel del ABC ligeramente mayor que Enbrel® (promedio de 198,1 frente a 172,9 µg*h/ml), aunque TNFR-hFc-5 mostró una semivida similar a Enbrel® (promedio 28,6 h frente a 29,4 h).

<Ejemplo 8> Bioactividad *in vivo* de las proteínas fusionadas a hFc purificadas

Para comparar la bioactividad *in vivo* de EPO-hFc-5 y Aranesp®, se trataron tres monos cynomolgus por grupo con una inyección SC o una única inyección IV en una dosis de 2.400 UI/kg. Se obtuvieron muestras de sangre de cada mono antes de la inyección y a 1, 3, 6, 12, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96, 120, 168, 336, 504 y 672 h después de la inyección. Se midió el número de diversas células de la sangre, incluyendo los reticulocitos para evaluar la bioactividad *in vivo* de EPO-hFc-5 y Aranesp®. Tal como se muestra en la Fig 9(a), EPO-hFc-5 mostró una potencia *in vitro* ligeramente mayor que Aranesp® en las rutas SC e IV en términos de aumento de los reticulocitos en monos.

Para investigar la bioactividad *in vivo* de G-CSF-hFc-1, se administraron LEUCOSTIM® filgrastim, (DongA, República de Corea) como control y G-CSF-hFc-1 en una dosis de 100 µg/kg mediante las rutas SC o IV a dos ratas Sprague Dawley macho (Charles River Laboratories, Wilmington) por grupo. Se obtuvo sangre utilizando un tubo de EDTA antes de la inyección y 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 192 h después de la inyección. Se trató cada muestra de sangre con tampón de lisis RBC (BD Bioscience, Corea) durante 4 minutos y se llevó a cabo un recuento de los leucocitos totales (glóbulos blancos) diluidos en tampón FACS por triplicado utilizando un hematocitómetro. Se midió el número de granulocitos usando FACSCalibur mediante la determinación del tamaño celular por FSC (dispersión frontal) y de los gránulos mediante SSC (dispersión lateral). Tal como se ilustra en la Fig. 9(b), LEUCOSTIM® tratado mediante las rutas SC e IV indujo el número máximo de leucocitos y granulocitos a las 24 horas de la inyección, mientras que G-CFS-hFc-1 indujo el número máximo de leucocitos y granulocitos a las 72 horas de la inyección SC y a las 48 horas de la inyección IV. Desde las 24 h a las 120 h después de la inyección, G-CSF-hFc-1

tuvo una bioactividad *in vivo* más sostenida, en comparación con LEUCOSTIM®.

Aplicabilidad industrial

5 Se dan a conocer proteínas de fusión que comprenden una molécula biológicamente activa y un dominio Fc de la inmunoglobulina (Ig) que están unidos a la molécula biológicamente activa. El dominio Fc es un dominio Fc humano híbrido de (i) IgG1, IgG2 o IgG4 o (ii) IgG4 e IgD. El Fc híbrido es útil como un vehículo de moléculas biológicamente activas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> GENEXINE CO LTD.
- <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE INMUNOGLOBULINA
- <130> SJK/FP6866917
- 15 <140> Divisional de EP 08766022.1
- <141> 30-05-2008
- <150> EP 08766022.1
- <151> 30-05-2008
- 20 <150> US60/940.753
- <151> 30-05-2007
- <160> 32
- 25 <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 720
- 30 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> fragmento 1 de Fc híbrido (hFc-1)
- 35 <400> 1

```

agcaacacca aggtggacaa gagagtggaa cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc      60
cctccctgcc ccgcccctcc cgtggccggc cccagcgtgt tcoctgtttcc tcccaagccc      120
aaggataccc tgatgatctc cagaaccctt gaggtgacct gogtggtcgt ggatgtgagc      180
caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg tacgtggatg gogtgggaagt gcacaacgoc      240
aagaccaagc ccagagaaga gcagttcaac tccacctaca gagtggtgag cgtgctgacc      300
gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaaggc      360
ctgcccagct ccatcgagaa gaccatcagc aaagccaaag gccagcccag agaaccctcag      420
gtgtacaccc tgcoctcccag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc      480
ctggtgaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc      540
gagaacaatt acaagacaac cctcccctg ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac      600
agcagactga ccgtggacaa gagcagatgg caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg      660
atgcacgaag ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag      720

```

40

ES 2 623 925 T3

<210> 2
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> fragmento 2 de Fc híbrido (hFC-2)

<400> 2

```

    acccccgagt gccccagcca caccagccc ctggggcgtgt tcctgttccc cccaagccc 60
    aaggacaccc tgatgatcag ccgcaccccc gaggtgacct gcgtggtcgt ggatgtgagc 120
    caggaagatc ccgaagtgca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaagt gcacaacgcc 180
    aagaccaagc ccagagaaga gcagttcaac tccacctaca gagtggtagc cgtgctgacc 240
    gtgctgcacc aggaactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaaggc 300
    ctgcccagct ccatcgagaa gaccatcagc aaagccaaag gccagcccag agaaccccag 360
    gtgtacaccc tgccctccag ccaggaagag atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc 420
    ctggtgaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggaaagcaa cggccagccc 480
    gagaacaatt acaagacaac ccctcccgtg ctggatagcg atggcagctt ctttctgtac 540
    agcagactga ccgtggaaa gagcagatgg caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg 600
    atgcacgaag ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag 660
    
```

10

<210> 3
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> fragmento 3 de Fc híbrido (hFC-3)

<400> 3

20

ES 2 623 925 T3

gagcgcgaga ccaagacccc cgagtgcccc agccacacccc agcccctggg cgtgttcctg 60
 ttccccccca agcccaagga caccctgatg atcagccgca cccccgaggt gacctgcgtg 120
 gtcgtggatg tgagccagga agatcccgaag gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg 180
 gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg 240
 gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 300
 gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag 360
 cccagagaaac cccaggtgta caccctgcct cccagccagg aagagatgac caagaaccag 420
 gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgggaa 480
 agcaacggcc agcccagaaa caattacaag acaaccctc ccgtgctgga tagcgatggc 540
 agcttctttc tgtacagcag actgaccgtg gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg 600
 ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc 660
 ctgagcctgg gcaag 675

5 <210> 4
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fragmento 4 de Fc hibrido (hFC-4)
 <400> 4

aagaaggaga aggagaagga ggagcaggag gagcgcgaga ccaagacccc cgagtgcccc 60
 agccacacccc agcccctggg cgtgttcctg ttccccccca agcccaagga caccctgatg 120
 atcagccgca cccccgaggt gacctgcgtg gtcgtggatg tgagccagga agatcccgaag 180
 gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga 240
 gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac 300
 tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc 360
 gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag cccagagaaac cccaggtgta caccctgcct 420
 cccagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttc 480
 taccocagcg acatcgccgt ggagtgggaa agcaacggcc agcccagaaa caattacaag 540
 acaaccctc ccgtgctgga tagcgatggc agcttctttc tgtacagcag actgaccgtg 600
 gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg 660
 cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc ctgagcctgg gcaag 705

15 <210> 5
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 623 925 T3

<220>
 <223> fragmento 5 de Fc híbrido (hFC-5)

<400> 5

5

```

cgcaacaccg gccgcggcgg cgaggagaag aagaaggaga aggagaagga ggagcaggag    60
gagcgcgaga ccaagacccc cgagtgcccc agccacaccc agcccctggg cgtgttcctg    120
ttcccccca agccaagga caccctgatg atcagccgca ccccgaggt gacctgcgtg    180
gtcgtggatg tgagccagga agatcccgaa gtgcagttca actggtacgt ggatggcgtg    240
gaagtgcaca acgccaagac caagccaga gaagagcagt tcaactccac ctacagagtg    300
gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag    360
gtgtccaaca aaggcctgcc cagctccatc gagaagacca tcagcaaagc caaaggccag    420
cccagagaac cccaggtgta caccctgcct cccagccagg aagagatgac caagaaccag    480
gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttc taccocagcg acatgcctgt ggagtgggaa    540
agcaacggcc agcccgagaa caattacaag acaaccctc cctgctgga tagcgtggc    600
agcttcttcc tgtacagcag actgaccgtg gacaagagca gatggcagga aggcaacgtg    660

ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgtcc    720
ctgagcctgg gcaag    735
    
```

<210> 6
 <211> 864
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Fragmento 6 de Fc híbrido (hFc-6)

15

<400> 6

ES 2 623 925 T3

gctagcaaga gcaagaagga gatcttccgc tggcccgaga gcccgaaggc ccaggccagc 60
 agcgtgcccc ccgcccagcc ccaggccgag ggcagcctgg ccaaggccac caccgcccc 120
 gccaccaccc gcaacaccgg cggggcgggc gaggagaaga agaaggagaa ggagaaggag 180
 gagcaggagg agcgcgagac caagaccccc gagtgccca gccacacca gccctgggc 240
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagccgac ccccgagggtg 300
 acctgcgtgg tcgtggatgt gagccaggaa gatcccgaag tgcagttcaa ctggtacgtg 360
 gatggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagccagag aagagcagtt caactccacc 420
 tacagagtgg tgagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 480
 aagtgcaagg tgtccaacaa aggcctgccc agctocatg agaagaccat cagcaaagcc 540
 aaaggccagc ccagagaacc ccagggtgtac acctgcctc ccagccagga agagatgacc 600
 aagaaccag tgtccctgac ctgcctgggtg aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 660
 gagtgggaaa gcaacggcca gcccgagaac aattacaaga caaccctcc cgtgctggat 720
 agcgatggca gcttctttct gtacagcaga ctgaccgtgg acaagagcag atggcaggaa 780
 ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaagccctgc acaaccacta caccagaag 840
 agcctgtccc tgagcctggg caag 864

<210> 7
 <211> 579
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Gen de EPO humana sintetizado de acuerdo con la optimización de codones

10

<400> 7

atgggcgtgc acgagtgcc cgctggtg tggctgctgc tgagcctgct gagcctgcc 60
 ctgggcctgc ccgtgctggg ccccccccc cgctgatct gcgacagccg cgtgctggag 120
 cgctacctgc tggaggccaa ggaggccgag aacatcacca ccggctgcgc cgagcactgc 180
 agcctgaacg agaacatcac cgtgcccagc accaaggtga acttctacgc ctggaagcgc 240
 atggaggtgg gccagcaggc cgtggaggtg tggcagggcc tggccctgct gagcgaggcc 300
 gtgctgcgcg gccaggccct gctggtgaac agcagccagc cctgggagcc cctgcagctg 360
 cacgtggaca aggcctgag cggcctgccc agcctgacca cctgctgctg cgcctgggc 420
 gccagaagg aggcctcag cccccccgac gccgcccagc ccgccccct ggcaccatc 480
 accgcccaca ccttccgcaa gctgttccgc gtgtacagca acttctgctg cggcaagctg 540
 aagctgtaca ccggcgaggc ctgcccagc ggcgaccgc 579

15 <210> 8

ES 2 623 925 T3

<211> 612
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Gen de G-CSF humano sintetizado de acuerdo con la optimización de codones

<400> 8

```

atggccggcc cggccaccca gagcccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg    60
cacagcggcc tgtggaccgt gcaggaggcc acccccctgg gccccgccag cagcctgccc    120
cagagcttcc tgctgaagtg cctggagcag gtgogcaaga tccagggcga cggcgccgcc    180
ctgcaggaga agctgtgctc cacctacaag ctgtgccacc cggaggagct ggtgctgctg    240
ggccacagcc tgggcatccc ctgggcccc ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag    300
ctggccggct gcctgagcca gctgcacagc ggctgttcc tgtaccaggc cctgctgcag    360
gcctggagg gcacagccc cgagctgggc cccaccctgg acaccctgca gctggacgtg    420
gcccacttgc ccaccaccat ctggcagcag atggaggagc tgggcatggc ccccgccctg    480
cagcccaccc agggcgccat gccgccttc gccagcgcct tccagcgcgc cgcggcgggc    540
gtgctggtgg ccagccacct gcagagcttc ctggagggtga gctaccgctg gctgcccacc    600
ctggcccagc cc                                                    612
    
```

10

<210> 9
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Gen p40 humano sintetizado de acuerdo con la optimización de codones

20

<400> 9

```

atgtgccacc agcagctggt gatcagctgg ttcagcctgg tgttctctgg cagccccctg    60
gtggccatct gggagctgaa gaaggacgtg tacgtggtgg agctggactg gtaccccgac    120
gcccccgggc agatggtggt gctgacctgc gacaccccg aggaggacgg catcacctgg    180
accctggacc agagcagcga ggtgctgggc agcggcaaga cctgaccat ccaggtgaag    240
gagttcggcg acgcccggca gtacacctgc cacaagggcg gcgaggtgct gagccacagc    300
    
```

ES 2 623 925 T3

ctgctgctgc tgcacaagaa ggaggacggc atctggagca cgcacatcct gaaggaccag 360
 aaggagccca agaacaagac cttcctgcgc tgcgaggcca agaactacag cggcogcttc 420
 acctgctggt ggctgaccac catcagcacc gacctgacct tcagcgtgaa gagcagccgc 480
 ggcagcagcg acccccaggg cgtgacctgc ggcgcgcgca ccctgagcgc cgagcgcgtg 540
 cgcggcgaca acaaggagta cgagtacagc gtggagtgcc aggaggacag cgcctgcccc 600
 gccgccgagg agagcctgcc catcgaggtg atgggtggacg ccgtgcacaa gctgaagtac 660
 gagaactaca ccagcagctt cttcatccgc gacatcatca agcccgaccc cccaagaac 720
 ctgcagctga agcccctgaa gaacagccgc caggtggagg tgagctggga gtaccccagc 780
 acctggagca cccccacag ctacttcagc ctgaccttct gcgtgcaggt gcagggcaag 840
 agcaagcgcg agaagaagga ccgcgtgttc accgacaaga ccagcgcac cgtgatctgc 900
 cgcaagcagg ccagcatcag cgtgcgcgcc caggaccgct actacagcag cagctggagc 960
 gagtgggcca gcgtgcctg cagc 984

<210> 10
 <211> 5698
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> pAD11

10

<400> 10

ES 2 623 925 T3

gacggatcgg gactagagca ttgggggggg ggacagctca gggctgogat ttcgcgccaa 60
acttgacggc aatcctagcg tgaaggctgg taggatttta tccccgctgc catcatggtt 120
cgaccattga actgcatcgt cgccgtgtcc caaaatatgg ggattggcaa gaacggagac 180
ctaccctggc ctccgctcag gaacgagttc aagtacttcc aaagaatgac cacaacctct 240
tcagtggaag gtaaacagaa tctggtgatt atgggtagga aaacctggtt ctccattcct 300
gagaagaatc gacotttaaa ggacagaatt aatatagttc tcagtagaga actcaaagaa 360
ccaccacgag gagctcattt tcttgccaaa agtttggatg atgccttaag acttattgaa 420
caaccggaat tggcaagtaa agtagacatg gtttggatag tcggaggcag ttctgtttac 480
caggaagcca tgaatcaacc aggcacctc agactctttg tgacaaggat catgcaggaa 540
tttgaaagtg acacgttttt ccagaaatt gatttgggga aatataaact tctccagaa 600
taccagggcg tcctctctga ggtocaggag gaaaaaggca tcaagtataa gtttgaagtc 660
tacgagaaga aagactaaca ggaagatgct ttcaagttct ctgctcccct cctaaagcta 720
tgcattttta taagaccatg ggacttttgc tggctttaga tctttgtgaa ggaaccttac 780
ttctgtggtg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga tttaaagctc taaggtaaat 840
ataaaatfff taagtgata atgtgttaa ctactgattc taattgtttg tgtattttag 900

ES 2 623 925 T3

attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtga atgcctttaa tgaggaaaac 960
 ctgttttgct cagaagaaat gccatctagt gatgatgagg ctactgctga ctctcaacat 1020
 tctactcctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagacccca aggactttcc ttcagaattg 1080
 ctaagttttt tgagtcatgc tgtgtttagt aatagaactc ttgcttgctt tgctatttac 1140
 accacaaagg aaaaagctgc actgctatac aagaaaatta tggaaaaata ttctgtaacc 1200
 tttataagta ggcataacag ttataatcat aacatactgt tttttcttac tccacacagg 1260
 catagagtgt ctgctattaa taactatgct caaaaattgt gtacctttag ctttttaatt 1320
 tgtaaagggg ttaataagga atatttgatg tatagtgcct tgactagaga tcataatcag 1380
 ccataaccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac cccccacacc tccccctgaa 1440
 cctgaaacat aaaatgaatg caattggtgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg 1500
 ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 1560
 tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggatct cccgatcccc 1620
 tatgggtcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatctgctcc 1680
 ctgcttggtg gttggaggtc gctgagtagt gcgagagcaa aatttaagct acaacaaggc 1740
 aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc tgcttagggt taggcgtttt gcgctgcttc 1800
 gcgatgtacg ggccagatat acgcgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat 1860
 caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg 1920
 taaatggccc gcctggctga ccgcccacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt 1980
 atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgagc tcaatgggtg gagtatttac 2040
 ggtaaaactc ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac ccccctattg 2100
 acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact 2160
 ttctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt 2220
 ggcagtacat caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc 2280
 ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgct 2340
 gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata 2400
 taagcagagc tctctggcta actagagaac ccactgctta ctggcttacc gaaattaata 2460
 cgactcacta tagggagacc caagctggct agcgtgagtt tggggaccct tgattgttct 2520
 ttctttttcg ctattgtaaa attcatgtta tatggagggg gcaaagtttt cagggtgttg 2580
 tttagaacgg gaagatgtcc cttgtatcac catggaccct catgataatt ttgtttcttt 2640
 caotttctac tctgttgaca accattgtct cctcttattt tottttcatt ttctgtaact 2700
 ttttcgtaa acttttagctt gcatttgtaa cgaattttta aattcacttt tgtttatttg 2760
 tcagattgta agtactttct ctaatcactt tttttcaag gcaatcaggg tatattatat 2820
 tgtacttcag cacagtttta gagaacaatt gttataatta aatgataagg tagaatattt 2880

ES 2 623 925 T3

ctgcatataa attctggctg gcgtggaaat attcttattg gtagaaacaa ctacatcctg 2940
gtcatcatcc tgcctttctc tttatgggta caatgatata cactggttga gatgaggata 3000
aaatactctg agtccaaacc gggcccctct gctaaccatg ttcatgcctt cttctttttc 3060
ctacagctcc tgggcaacgt gctgggtatt gtgctgtctc atcatttttg caaagaattg 3120
taatacgact cactataggg cgaattgaag cttggtaccg agctcggatc cactagtcca 3180
gtgtgggtga attcaccgcy gccgctctag agggccctat tctatagtgt cacctaaatg 3240
ctagagctcg ctgatcagcc togactgtgc cttctagttg ccagccatct gttggttgcc 3300
cctccccctg gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tctaataaa 3360
atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg 3420
ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatgcggtg 3480
gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca gctggggctc gagagcttg cgtaatcatg 3540
gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgta tccgctcaca attccacaca acatacgagc 3600
cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtc ctaatgagt agctaactca cattaattgc 3660
gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaataat 3720
cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcy tattgggcgc tcttccgctt cctcgcctac 3780
tgactcctg cgctcggctg ttgggctgcy gcgagcggta tcagctcact caaaggcgg 3840
aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca 3900
gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttcata ggctccgcc 3960
ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 4020
ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctcccctcgt cgctctcctg ttcogacct 4080
gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag 4140
ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 4200
cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcca 4260
cccggtaaga cagcacttat cgcactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 4320
gaggtatgta gggcgtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 4380
aagaacagta tttgggtatc gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttg 4440
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 4500
gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggctc 4560
tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag 4620
gatcttcacc tagatccttt taaattaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata 4680
tgagtaaact tggctcaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaceta tctcagcgt 4740
ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg actccccctc gtgtagataa ctacgatacg 4800

ES 2 623 925 T3

```

ggagggctta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gtcaccggc 4860
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggcc gagcgcagaa gtggctctgc 4920
aaactttatcc gcctocatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc 4980
gccagttaat agtttgogca acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc 5040
gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc 5100
ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc ctccggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa 5160
gttgccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 5220
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat tctgagaata 5280
gtgtatgocg cgaccgagtt gctcttgccc ggogtcaata cgggataata ccgcgccaca 5340
tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactotcaag 5400
gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc 5460
agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc 5520
aaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttc tttttcaata 5580
ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta 5640
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 5698

```

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Región constante de la IgG1 humana parcial (N.º de acceso de GenBank CAA75032)

<400> 11

```

Ala Ser Phe Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
          65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          115          120          125

```

ES 2 623 925 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

5 <210> 12
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Región constante de la IgG2 humana (N.º de acceso de GenBank CAC20455)

<400> 12

ES 2 623 925 T3

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

ES 2 623 925 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Trp Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Cys Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13

<211> 327

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Región constante de la IgG4 humana parcial (N.º de acceso de GenBank AAH25985)

<400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

ES 2 623 925 T3

<210> 14
<211> 383
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<223> Región constante de la IgD humana (N.º de acceso de GenBank P01880)

10

<400> 14

ES 2 623 925 T3

Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg
1 5 10 15

His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly
20 25 30

Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser
35 40 45

Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
50 55 60

Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
85 90 95

Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
100 105 110

Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala
115 120 125

Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
130 135 140

Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
145 150 155 160

Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala
165 170 175

Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val
180 185 190

Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly
195 200 205

Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser
210 215 220

Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu
225 230 235 240

Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu
245 250 255

Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro
260 265 270

Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala
275 280 285

Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile
290 295 300

Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe
305 310 315 320

ES 2 623 925 T3

Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala
 325 330 335
 Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr
 340 345 350
 Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala
 355 360 365
 Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met
 370 375 380

<210> 15
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Precursor de la EPO humana (N.º de acceso de GenBank NP_000790)

<400> 15

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190
 Arg

ES 2 623 925 T3

<210> 16
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> G-CSF humano (N.º de acceso de GenBank CAA27291)

<400> 16

10

```

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
 1           5           10
Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro
      20           25           30
Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
      35           40           45
Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
      50           55           60
Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
      65           70           75
Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
      85           90           95
Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
      100          105          110
Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
      115          120          125
Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
      130          135          140
Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
      145          150          155          160
Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
      165          170          175
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
      180          185          190
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
      195          200          205
    
```

<210> 17
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> subunidad p40 de la IL12 humana (N.º de acceso de GenBank AAG32620)

<400> 17

20

```

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1           5           10           15
    
```

ES 2 623 925 T3

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

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

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
325

ES 2 623 925 T3

<210> 18

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de hFc-1

10 <400> 18

```

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 1           5           10           15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
          20           25           30

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
          35           40           45

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 50           55           60

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 65           70           75           80

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
          85           90           95

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
          100          105          110

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 115          120

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 130          135          140

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 145          150          155          160

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
          165          170          175

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 180          185          190

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 195          200          205

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 210          215          220

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 225          230          235          240

```

<210> 19

<211> 220

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

ES 2 623 925 T3

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de hFc-2

<400> 19

5

```

    Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe
      1           5           10           15

    Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
      20           25           30

    Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
      35           40           45

    Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
      50           55           60

    Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
      65           70           75           80

    Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
      85           90           95

    Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
      100          105          110

    Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
      115          120          125

    Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
      130          135          140

    Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
      145          150          155          160

    Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
      165          170          175

    Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
      180          185          190

    Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      195          200          205

    Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      210          215          220
    
```

<210> 20
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de hFc-3

<400> 20

15

ES 2 623 925 T3

Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu
 1 5 10 15
 Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 100 105 110
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 210 215 220
 Lys
 225

<210> 21
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de hFc-4

<400> 21

ES 2 623 925 T3

Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr
 1 5 10 15
 Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro
 20 25 30
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 35 40 45
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 50 55 60
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 85 90 95
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 100 105 110
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 115 120 125
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 130 135 140
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 165 170 175
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 180 185 190
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 195 200 205
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 210 215 220
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 225 230 235

<210> 22
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de hFc-5

<400> 22

ES 2 623 925 T3

Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys
 1 5 10 15
 Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His
 20 25 30
 Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 35 40 45
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 50 55 60
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 65 70 75 80
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 85 90 95
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 100 105 110
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 115 120 125
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 130 135 140
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 145 150 155 160
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 165 170 175
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 180 185 190
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 195 200 205
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 210 215 220
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Leu Gly Lys
 245

<210> 23
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de hFc-6

<400> 23

ES 2 623 925 T3

Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys
1 5 10 15

Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser
20 25 30

Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg
35 40 45

Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu
50 55 60

Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly
65 70 75 80

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
85 90 95

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
100 105 110

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
115 120 125

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
145 150 155 160

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
165 170 175

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
180 185 190

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
195 200 205

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
210 215 220

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
225 230 235 240

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
245 250 255

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
260 265 270

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
275 280 285

<210> 24
<211> 377
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>

5

ES 2 623 925 T3

<223> Región constante de la IgG3 humana (N.º de acceso de GenBank CAC20456)

<400> 24

```

Ala Ser Phe Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1           5           10           15
Ser Thr Pro Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
           20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
           35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65           70           75           80
Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
           85           90           95
Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
           100           105           110
Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
           115           120           125
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130           135           140
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145           150           155           160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
           165           170           175
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
           180           185           190
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr

```


ES 2 623 925 T3

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

ES 2 623 925 T3

100					105					110					
Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln
		115					120					125			
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val
	130					135					140				
Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys
145					150					155					160
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro
				165					170					175	
Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys
			180					185					190		
Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu
		195					200					205			
Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys
	210					215					220				
Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val
225					230					235					240
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser
				245					250					255	
Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly
			260					265					270		
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile
	275						280					285			
Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu
	290					295					300				
Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp
305					310					315					320
Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser
				325					330					335	
Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly
			340					345					350		
Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val
	355						360					365			
Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
	370					375						380			
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu
385					390					395					400
Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys
				405					410					415	
Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu
			420					425					430		
Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val
		435					440					445			

ES 2 623 925 T3

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu

<210> 26
 <211> 762
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> fragmento 1 de Fc híbrido (thFc-1)

10

<400> 26

ES 2 623 925 T3

atggatgcca tgctgagagg cctgtgctgc gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg 60
 agcccctccg aacccaagag ctgcgacaag acccacacct gccctccctg ccccgccctt 120
 cccgtggccg gccccagcgt gttcctgttt cctcccaagc ccaaggatac cctgatgatc 180
 tccagaacct ctgaggtgac ctgctgtgtc gtggatgtga gccaggaaga tcccgaagtg 240
 cagttcaact ggtacgtgga tggcgtgga gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagaa 300
 gagcagttca actccaccta cagagtgtg agcgtgctga ccgtgctgca ccagactggg 360
 ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtg tccaacaaag gcctgccag ctccatcgag 420
 aagaccatca gcaaagccaa aggccagccc agagaacccc aggtgtacac cctgcctccc 480
 agccaggaag agatgaccaa gaaccaggtg tccttgacct gcctggtgaa aggcttctac 540
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggaaagc aacggccagc ccgagaacaa ttacaagaca 600
 acccctcccg tgctggatag cgatggcagc ttctttctgt acagcagact gaccgtggac 660
 aagagcagat ggcaggaagg caacgtgtc agctgcagcg tgatgcacga agccctgcac 720
 aaccactaca cccagaagag cctgtccctg agcctgggat cc 762

<210> 27
 <211> 759
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223 fragmento 2 de Fc híbrido (thFc-2)

10

<400> 27

atggatgcca tgctgagagg cctgtgctgc gtgctgctgc tgtgcggcgc cgtgttcgtg 60
 agcccctcca aggaggagca ggaggagcgc gagaccaaga ccccagagtg cccagccac 120
 acccagcccc tgggcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc 180
 cgcacccccg aggtgacctg cgtggtcgtg gatgtgagcc aggaagatcc cgaagtgcag 240
 ttcaactggt acgtggatgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaagag 300
 cagttcaact ccacctacag agtggtgagc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 360
 aacggcaagg agtacaagtg caaggtgtcc aacaaaggcc tgcccagctc catcgagaag 420
 accatcagca aagccaaagg ccagcccaga gaaccccagg tgtacacct gcctcccagc 480
 caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgcc tggtgaaagg ottctacccc 540
 agcgacatcg ccgtggagtg ggaaagcaac ggcagcccc agaacaatta caagacaacc 600
 cctcccgtgc tggatagcga tggcagcttc tttctgtaca gcagactgac cgtggacaag 660
 agcagatggc aggaaggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaagc cctgcacaac 720
 cactacaccc agaagagcct gtcctgagc ctgggcaag 759

15

ES 2 623 925 T3

<210> 28
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de thFc-1

10

```

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1           5           10           15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
          20           25           30

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
          35           40           45

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 50           55           60

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 65           70           75           80

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
          85           90           95

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
          100          105          110

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 115          120          125

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 130          135          140

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 145          150          155          160

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
          165          170          175

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
          180          185          190

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 195          200          205

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 210          215          220

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 225          230          235          240

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Ser
          245          250
    
```

<210> 29
 <211> 253
 <212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de thFc-2

5

<400> 29

```

Met Asp Ala Met Leu Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1          5          10
Ala Val Phe Val Ser Pro Ser Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr
          20          25          30
Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu
          35          40          45
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
          50          55          60
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 65          70          75          80
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
          85          90          95
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
          100          105          110
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
          115          120          125
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
          130          135          140
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
          145          150          155          160
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          165          170          175
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
          180          185          190
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
          195          200          205
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
          210          215          220
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
          225          230          235          240
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
          245          250

```

10

<210> 30

<211> 771

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Gen del receptor 2 del TNF soluble humano sintetizado de acuerdo con la optimización de codones

ES 2 623 925 T3

<400> 30

```

atggctcccg tggccgtgtg ggcctctctg gccgtgggcc tggagctgtg ggccgctgcc      60
caogccctgc ctgccaggt ggcctttaca ccctatgtct cagagcccgg cagcacctgc      120
agactgagag agtactacga ccagacagcc cagatgtgtt gcagcaagtg cagccccggc      180
cagcaogcca aggtgttctg caccaagacc agcgacaccg tgtgtgacag ctgctgaggac      240
agcacctaca occagctgtg gaactgggtg cccgagtgcc tgagctgtgg cagcagatgc      300
agctccgacc aggtggagac ccaggcctgc accagagagc agaatagaat ctgcacctgc      360
agacctggct ggtactgtgc cctgagcaag caggagggct gcagactgtg tgcccctctg      420
agaaagtgca gacctggctt tggcgtggcc agaccggca cagagaccag cgacgtgggtg      480
tgcaaaccct gtgcccctgg caccttcagc aacaccacat ccagcacoga catctgcaga      540
ccccaccaga tctgcaacgt ggtggccatt cccggcaatg ccagcatgga tgccgtgtgc      600
accagcacca gccccaccag aagcatggcc cctggcgccg tgcacctgcc ccagcccggtg      660
agcaccagaa gccagcacac ccagcccaca cccgagccca gcacagcccc tagcaccagc      720

ttcctgctgc ccatgggcc cagccctcct gccgagggca gcacaggcga t                771

```

- 5 <210> 31
- <211> 257
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> receptor 2 del TNF soluble humano codificado por el gen sintetizado de acuerdo con la optimización de codones
- 15 <400> 31

ES 2 623 925 T3

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30
 Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45
 Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60
 Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80
 Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95
 Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110
 Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125
 Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140
 Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160
 Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175
 Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Engarce de Gly-Ser

10

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido quimérico que es una fusión que comprende (i) un polipéptido híbrido IgG-IgD y (ii) un polipéptido, una proteína o un péptido fusionado en el extremo N o el extremo C del polipéptido híbrido IgG-IgD, en el que (i) el polipéptido híbrido IgG-IgD se representa por la siguiente fórmula:

5
$$N'-(Z1)P-Y-Z2-Z3-Z4-C'$$

en la que:

N' es el extremo N y C' es el extremo C del polipéptido.

Z1 es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 a 9 restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 90 a 98 de la SEQ ID NO: 14;

10 Y es una secuencia de aminoácidos que consta de 5 o más restos de aminoácidos consecutivos procedentes del lado del extremo C de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 99 a 162 de la SEQ ID NO: 14;

Z2 es una secuencia de aminoácidos que consta de 4 a 37 restos de aminoácidos consecutivos del lado del extremo N de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 163 a 199 de la SEQ ID NO: 14

15 Z3 es una secuencia de aminoácidos que consta de 73 a 106 restos de aminoácidos consecutivos del lado del extremo C de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 115 a 220 de la SEQ ID NO: 13;

Z4 es una secuencia de aminoácidos que consta de los restos de aminoácidos en las posiciones 221 a 327 de la SEQ ID NO: 13; y

p es un número entero de 0 o 1; y

20 en el que (ii) el polipéptido, la proteína o el péptido es una hormona, citocina, factor de crecimiento, molécula coestimulante, receptor hormonal, receptor de citocinas, receptor del factor de crecimiento o péptido corto.

2. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, en el que p es 0.

3. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido híbrido IgG-IgD tiene la secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22 o 23.

25 4. El polipéptido quimérico de la reivindicación 1, en el que la fusión del polipéptido, la proteína o el péptido tiene una semivida en circulación aumentada en comparación con la semivida en circulación de la forma natural.

30 5. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido, proteína o péptido es EPO, G-CSF, GM-CSF, insulina, hormona del crecimiento humano, GLP-1, p40, receptor de TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, proteína 1 morfogenética ósea, betacelulina, interferón alfa, IL-10, FSH, Factor VII, CTLA4, IFN-beta, PD-1, IL-10R, CXCL-11, receptor de TGF-beta, TGF-beta, IL-17, IL-17R, BTC, OPG o RANK, o una de sus variantes o fragmentos.

6. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido, proteína o péptido es una variante de p40 que contiene la sustitución Asn303Gln.

35 7. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido, proteína o péptido es una proteína secretada, una forma madura de una proteína secretada, o una región Fab de un anticuerpo.

8. El polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polipéptido híbrido IgG-IgD y el polipéptido, proteína o péptido se acoplan entre sí mediante un engarce.

9. El polipéptido quimérico de la reivindicación 8, en el que el engarce es un engarce de albúmina o un engarce sintético.

40 10. El polipéptido quimérico de la reivindicación 9, en el que:

(a) dicho engarce de albúmina comprende las secuencias de aminoácidos 321 a 323, 318 a 325, 316 a 328, 313 a 330, 311 a 333 o 306 a 338 de la SEQ ID NO: 25; o

(b) dicho engarce sintético es un péptido de 10 a 20 restos de aminoácidos, en el que el péptido está compuesto por restos de Gly y Ser.

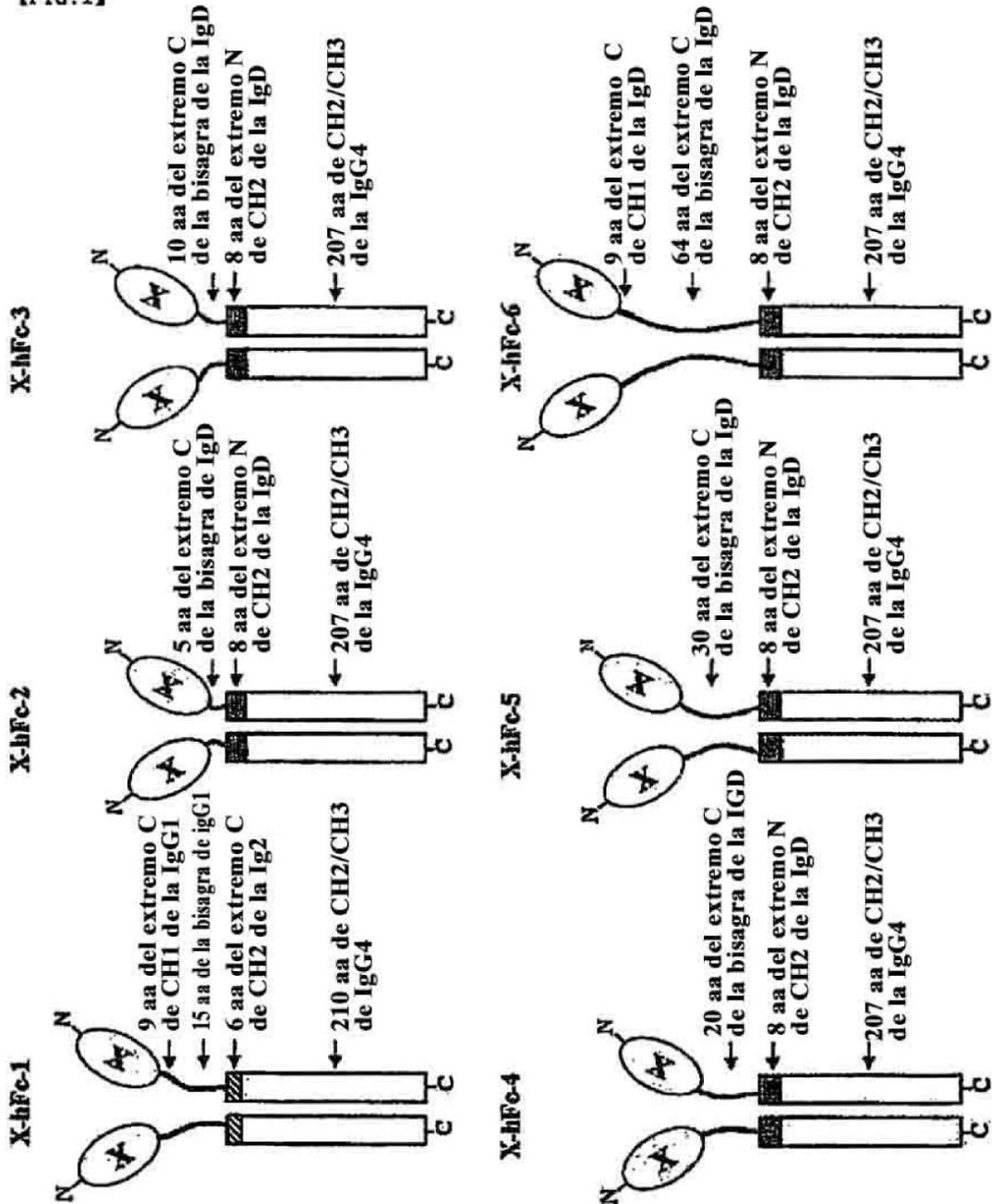
45 11. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

12. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.

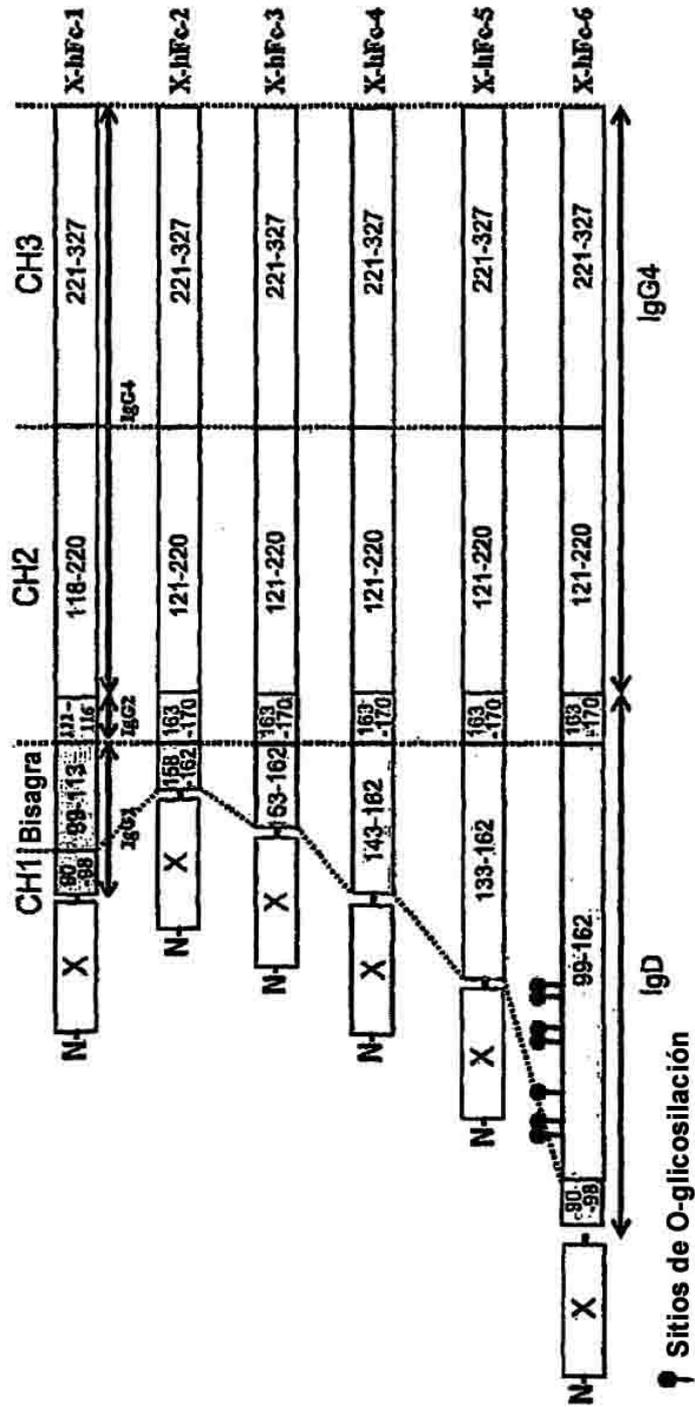
50 13. Un procedimiento de producción del polipéptido quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el procedimiento comprende las etapas de: (i) introducir una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 11 en una célula huésped de mamífero, (ii) hacer crecer la célula en condiciones en las que se pueda expresar el polipéptido en su medio de crecimiento, y (iii) cosechar el polipéptido expresado.

14. Un polipéptido quimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.

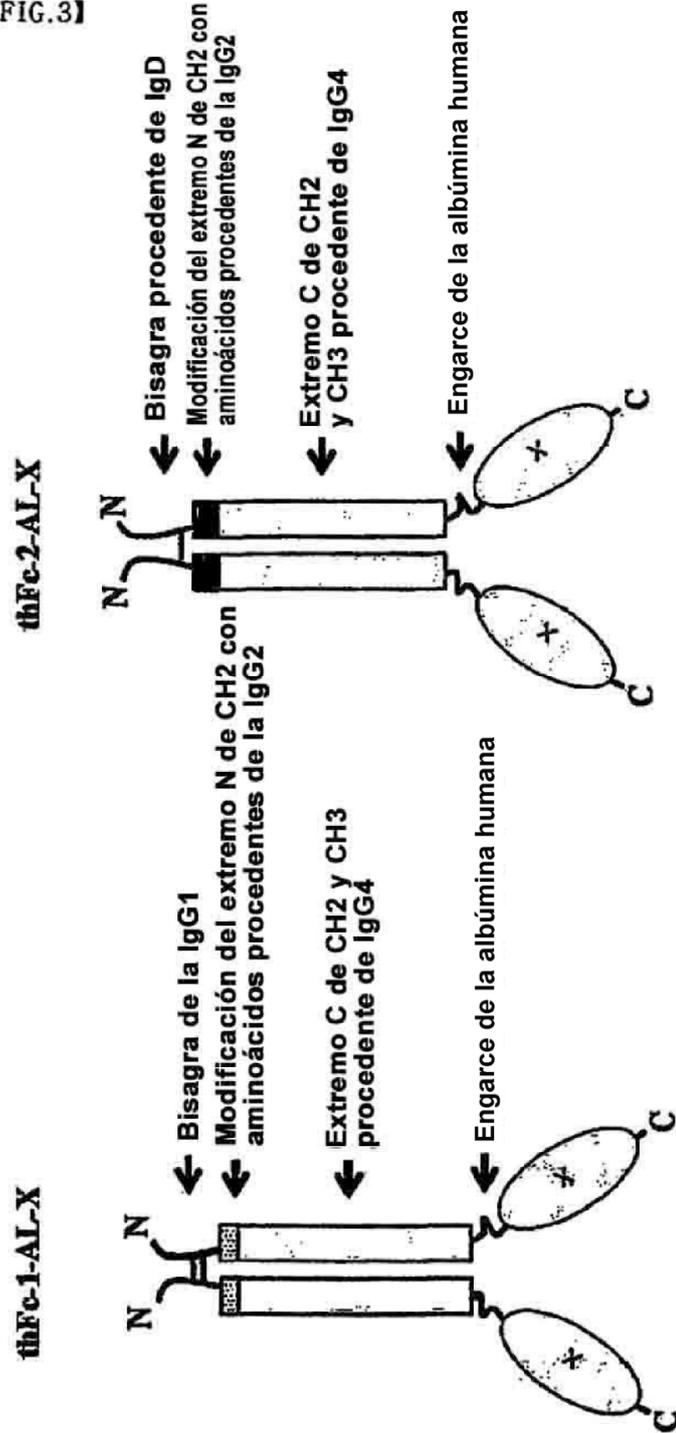
[FIG. 1]



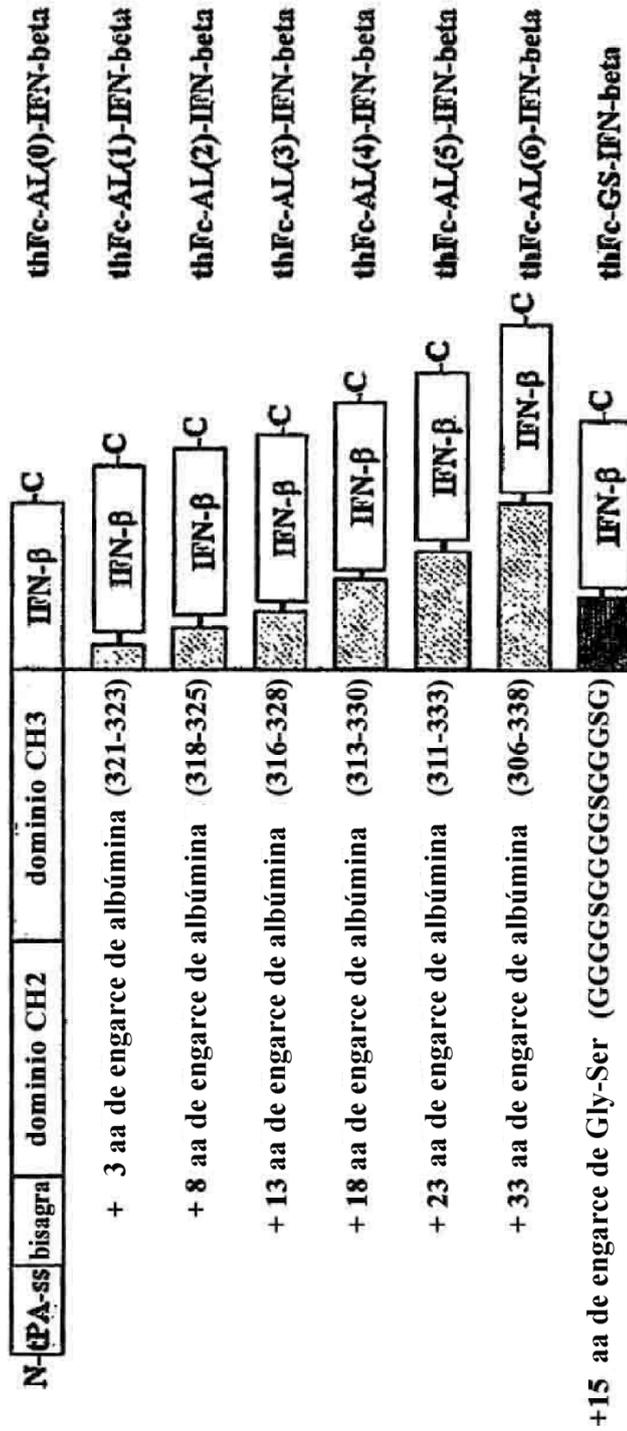
[FIG. 2]



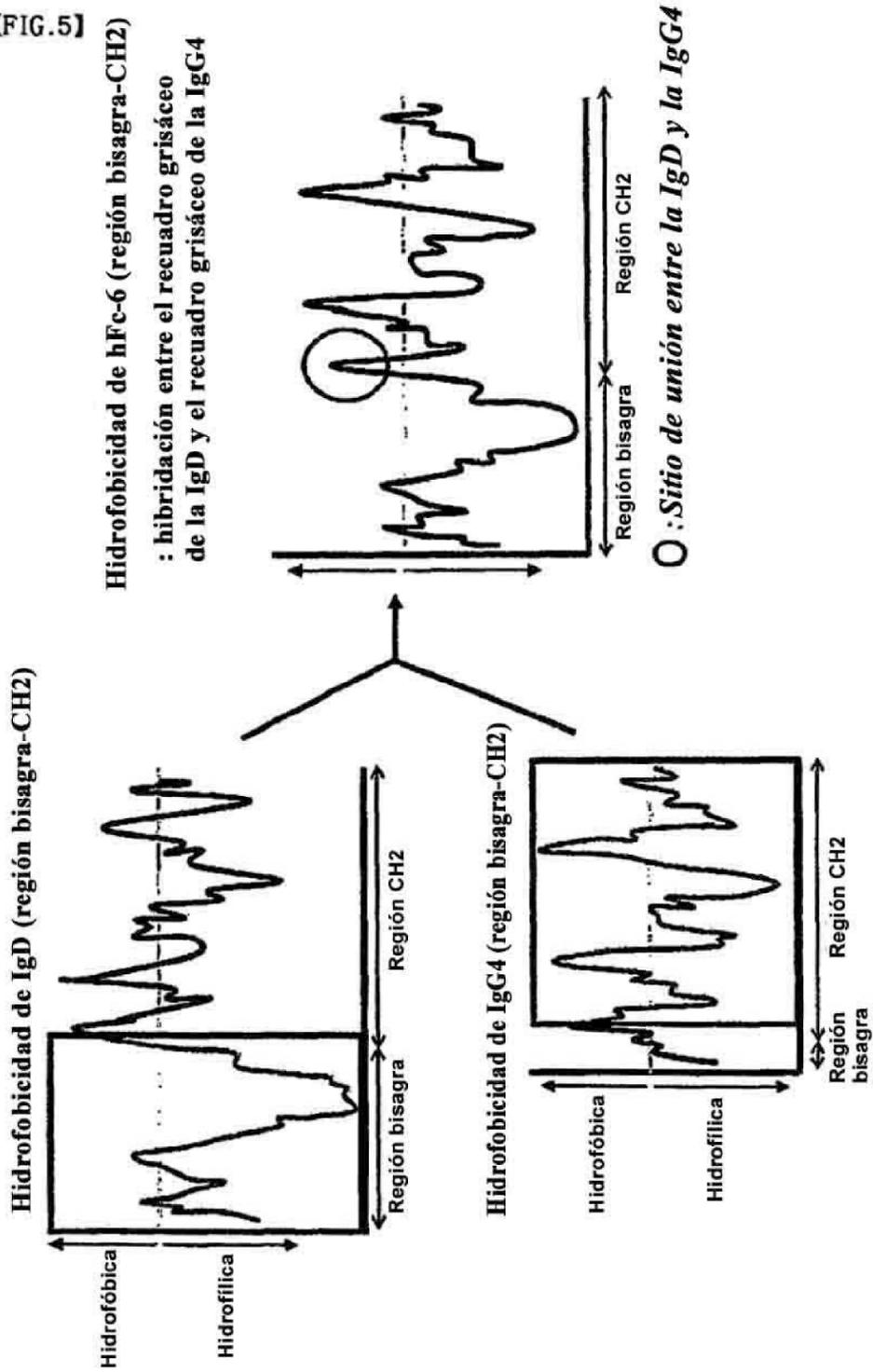
[FIG. 3]



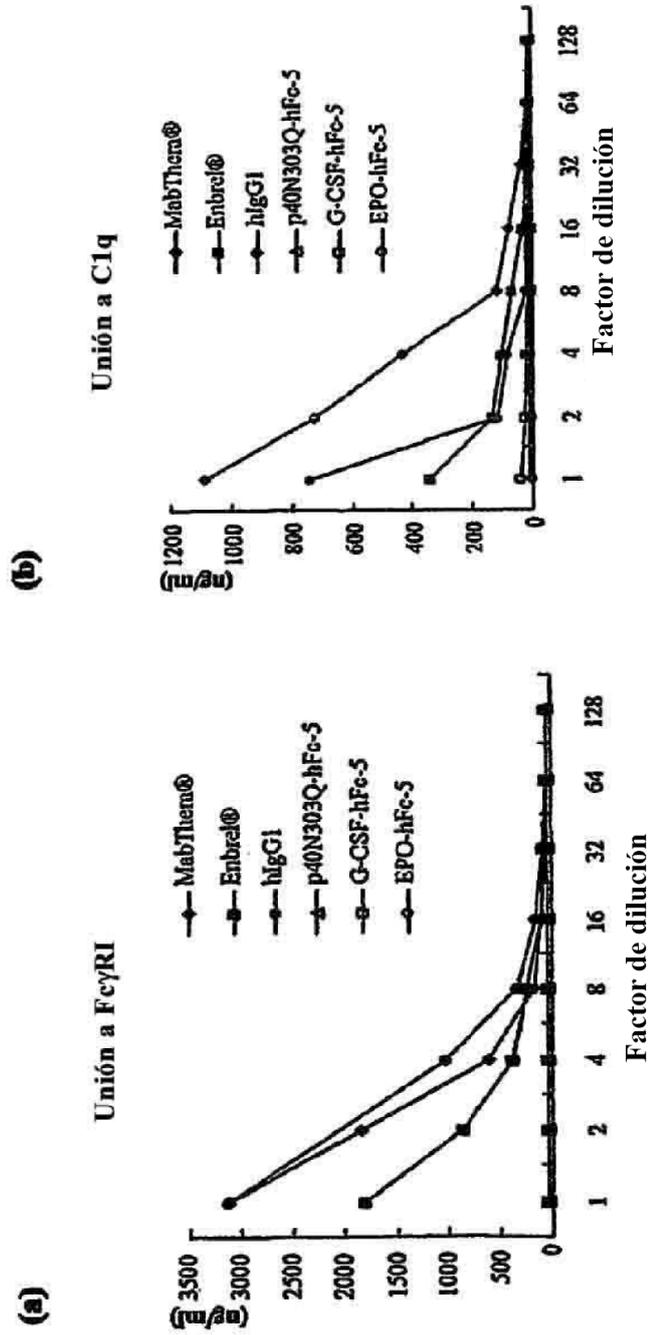
[FIG. 4]



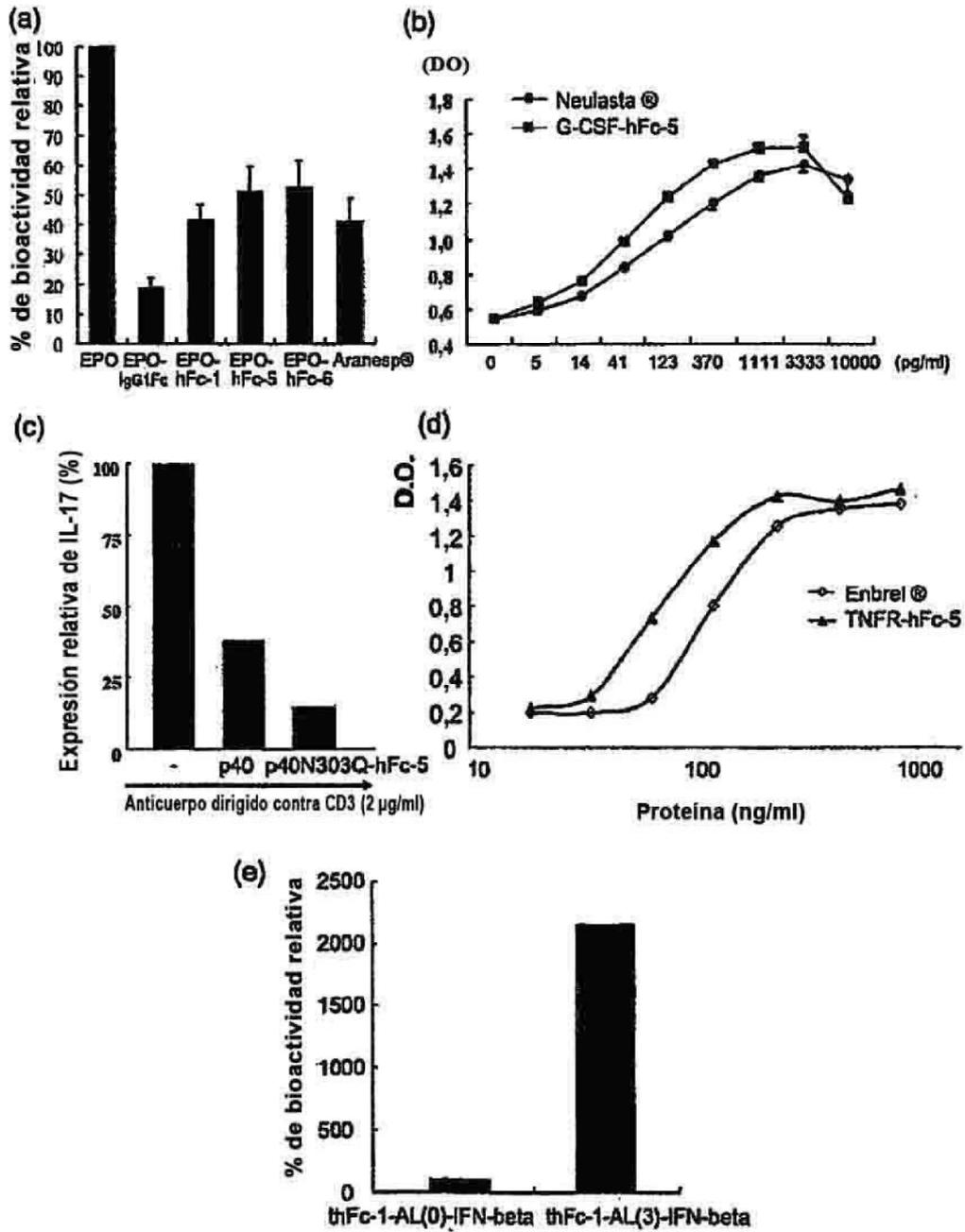
[FIG.5]



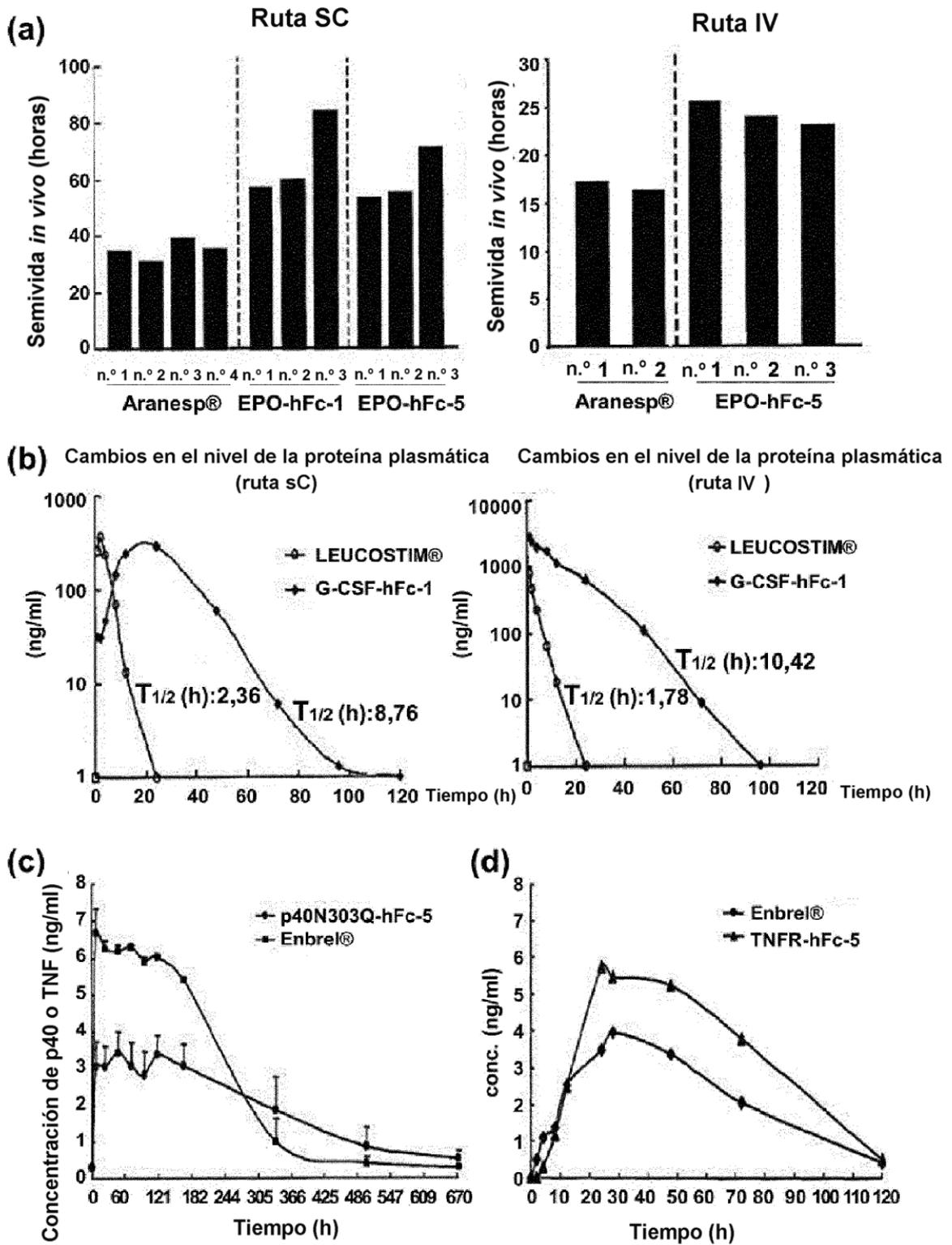
[FIG.6]



[FIG. 7]



[FIG. 8]



[FIG. 9]

