

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 049**

51 Int. Cl.:

C07K 14/735 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2013 PCT/EP2013/072741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068012**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2013 E 13798258 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2914624**

54 Título: **Variantes de receptor Fc gamma IIB**

30 Prioridad:

30.10.2012 US 201213663527

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**SUPREMOL GMBH (100.0%)
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried/München, DE**

72 Inventor/es:

**SONDERMANN, PETER;
TER MEER, DOMINIK;
POHL, THOMAS;
WINTER, RENO y
JACOB, UWE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 628 049 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

Variantes de receptor Fc gamma IIB

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de SEQ ID NO: 1; a un vector que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos y a una célula hospedadora que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos o dicho vector. La presente invención también se refiere a una proteína obtenida o que se puede obtener mediante la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos o de dicho vector en una célula hospedadora. Además, la presente invención se refiere a una proteína codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6. Además en la presente invención están comprendidas composiciones farmacéuticas y un método de preparación de las mismas. La presente invención también se refiere a una composición de materia que comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y/o 3, composición que puede comprender adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 y/o 5.

Antecedentes

Los FcγRs pertenecen a la familia de receptores Fc (FcRs) que son fundamentales para defender al organismo humano frente a infecciones. En general, se debe distinguir la activación de los FcγRs y la inhibición de los FcγRs. de los tres FcγRs principales en seres humanos, el FcγRI se puede unir a la IgG monomérica, mientras que FcγRII y FcγRIII se unen a complejos inmunológicos (CI) multivalentes formados por anticuerpos y antígenos (Takai, T. Nature Reviews Immunology 2002: 580-592.). Las funciones efectoras desencadenadas por los FcγRs incluyen, dependiendo del tipo de FcR expresado y de proteínas asociadas, endocitosis con posterior neutralización de los agentes patógenos y presentación de antígenos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), secreción de mediadores o la regulación de producción de anticuerpos (Fridman *et al.*, Immunol Rev. 1992;125: 49-76, van de Winkel y Capel Immunol Today. 1993: 14 (5): 215-21).

El documento WO 00/32767 describe receptores Fc solubles (FcRs) que están formados solamente por la parte extracelular del receptor y no están glicosilados. Debido a la ausencia del dominio trans membrana y del péptido señal, estas proteínas están presentes en una forma soluble y no unida a células. Además, los FcRs descritos en el documento WO 00/32767 se pueden producir de forma recombinante y se han sugerido para el tratamiento de enfermedades autoinmunes debido a su capacidad para unirse a la parte Fc de anticuerpo sin interferir con otros componentes del sistema inmunológico. El documento WO 00/32767 describe adicionalmente la estructura cristalina de ciertos FcRs y la posibilidad de encontrar sustancias que inhiban la interacción de IgG con los FcRs con la ayuda de estas estructuras cristalinas. El esclarecimiento de la estructura cristalina permite el hallazgo de inhibidores de este tipo mediante identificación sistemática de las bases de datos usando programas informáticos disponibles. La invención que se ha definido en el documento WO 03/043648 desarrolló adicionalmente los hallazgos del documento WO 00/32767 y proporciona métodos de tratamiento especialmente para enfermedades como la esclerosis múltiple (EM), lupus eritematoso sistémico (LES), y artritis reumatoide (AR) y también para enfermedades con un nivel elevado de linfocitos citolíticos naturales.

Cuando dichos receptores se produjeron de forma recombinante en procariontes y que por lo tanto estaban sin glicosilar, los inventores del documento WO 03/043648 encontraron de forma sorprendente que, aunque se esperaba que las proteínas no glicosiladas fueran poco solubles, los receptores se pudieran purificar con altas concentraciones de FcγR en una forma soluble. El documento WO 03/043648 y otras publicaciones documentan que los FcRs desempeñan un papel importante en reacciones de defensa del sistema inmunológico.

El documento EP1870422 desvela (SEQ ID NO: 1) dominio extracelular, FcγRIIb N-terminal humano, que consiste en 181 restos y que es idéntico en 176 aa con la SEQ ID NO: 1 presente.

Los receptores Fc desempeñan un papel fundamental en el sistema inmunológico en el que controlan del alcance y la fuerza de una respuesta inmunitaria. En particular se observó que un receptor Fc gamma IIB (sFcγRIIB) soluble (es decir, la parte extracelular de un receptor Fc gamma IIB), que compite con los FcγRs expresados en células inmunitarias para complejos inmunológicos patógenos es beneficioso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. La interferencia en una fase inicial de las reacciones inmunitarias que se producen en enfermedades de evita el desencadenamiento de la cascada que da como resultado inflamación y destrucción de tejidos. De forma específica, mientras tanto sFcγRIIB está en ensayos clínicos en fase II para la indicación de Trombocitopenia Inmune Primaria (TIP) y Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Como se sabe comúnmente, para el material biológico de ensayos clínicos, aquí se necesita sFcγRIIB que tenga preferentemente buenas propiedades de Química, Preparación y Control (CMC), tales como alta pureza y estabilidad durante la purificación. Por lo tanto, un objeto de la presente invención fue proporcionar proteínas de FcγRIIB humano con buenas propiedades de CMC. Este objeto se resuelve mediante las realizaciones reflejadas en las reivindicaciones, que se describen en el presente documento, ilustradas en los Ejemplos y Figuras.

De forma sorprendente para las proteínas tales como las que se describen en el presente documento se ha mostrado que se puede conseguir una purificación más elevada debido a una mejor solubilidad en concentraciones de sulfato de amonio que superan 1,5 M. La precipitación con sulfato de amonio es útil para retirar grandes

cantidades de proteínas contaminantes, como una primera etapa en muchos esquemas de purificación. Cuanto mayor es la concentración de sulfato de amonio, mejor es cuando se busca una proteína altamente pura, pero se deposita más estrés sobre la proteína, debido a la alta fuerza iónica del sulfato de amonio. Por lo tanto, cuanto más resistente al estrés es una proteína, mayor puede ser la concentración de sulfato de amonio y por lo tanto mayor será la pureza de la proteína. De forma específica, mediante la adición de los productos secundarios de sulfato de amonio cosmotrópico tales como especies desplegadas y plegadas de manera errónea, y además precipitan impurezas obtenidas a partir de células hospedadoras como componentes de la pared celular y proteínas. Con el aumento de la concentración de agente precipitante la eficacia de la precipitación aumentará y, por lo tanto, se obtiene una preparación de proteína altamente purificada, siempre y cuando la proteína de interés sea resistente a la precipitación a concentraciones tan altas de sulfato de amonio. Como se ha mencionado, de forma sorprendente se encontró que una proteína FcR como se describe en el presente documento es altamente soluble a concentraciones de sulfato de amonio iguales o superiores a 1,5 M. Esto no podía esperarse, puesto que las proteínas FcR de la técnica anterior se comportaban de manera diferente como se muestra en los Ejemplos y no había directrices en absoluto disponibles con respecto a cómo modificar una proteína FcR de modo que tiene el comportamiento y propiedades similares a las de la proteína FcR proporcionada por la presente invención. Como se ha mencionado, para la sorpresa de los presentes inventores, se encontró que las proteínas que se describen en el presente documento son ciertamente resistentes a las concentraciones elevadas de sulfato de amonio, permitiendo de este modo una buena purificación en comparación con las proteínas FcR de la técnica anterior, tales como las proteínas FcRIIB que se describen en el documento WO 00/32767 o en el documento WO 03/043648.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 1. La presente invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifica las proteínas mostradas en la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, o 9. La secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEQ ID NO: 6 codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. La presente invención también se refiere a un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, o 9.

Además, la presente invención también se refiere a una proteína obtenida o que se puede obtener mediante expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o el vector de la presente invención en una célula hospedadora, preferentemente una célula hospedadora procarionota, más preferentemente en *E. coli*.

Además, la presente invención también se refiere a una proteína que está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína obtenida o que se puede obtener mediante la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o el vector de la presente invención en una célula hospedadora o una proteína que está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6.

Además, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 y/o 3. Preferentemente, la composición de materia es una composición farmacéutica.

En una realización, la composición de materia de la presente invención comprende adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 4 y/o 5. Preferentemente, la composición de materia es una composición farmacéutica.

En otra realización, la composición de materia de la presente invención tiene la cantidad de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 que supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 3.

En otra realización, la composición de materia de la presente invención tiene la cantidad de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 que supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 3 y la cantidad de las proteínas de acuerdo con la SEQ ID No: 2 y 3 que supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 4 y/o 5.

Además, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 9. Preferentemente, la composición de materia es una composición farmacéutica.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o la célula hospedadora comprende el vector de la presente invención que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 1. La presente invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, o 9 o la célula hospedadora comprende el vector de la presente invención que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, o 9.

En una realización, la célula hospedadora de la presente invención es una célula hospedadora procariota o eucariota.

5 En otra realización de la presente invención, la célula hospedadora procariota es *E. coli*, preferentemente BL21 de *E. coli*, tal como BL21 (DE3).

La presente invención también se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica que comprende cultivar la célula hospedadora de la presente invención en condiciones que permitan la expresión de la proteína codificada, y recuperar la composición farmacéutica obtenida.

10

FIGURAS

Figura 1: a) Estructura cristalina de sFcγRII humano (entrada de PDB: 2FCB). La estructura núcleo invariable como se representa mediante la secuencia de aminoácidos de la variante 1 (SEQ ID No: 7) que es idéntica para todas las variantes de sFcR sometidas a ensayo en este estudio se muestra en color gris oscuro, los lazos que se supone que son importantes para la unión a IgG se representan en color gris claro y las extensiones N- y C-terminales se muestran en color negro. Los dos puentes disulfuro se representan con representación de bolas y varillas. La identidad de la estructura núcleo entre todas las variantes sometidas a ensayo también es evidente a partir del alineamiento de secuencias mostrado en la Figura 1b.

15

20

b) Alineamiento de secuencias de las variantes 1-4 de sFcR (abreviadas "var.") usadas en el presente estudio. SEQ ID NO: se abrevió como SEQ.

Figura 2: Resultados de la identificación sistemática de precipitación de FcR. Las variantes 1-4 de FcR se incubaron durante 1 h a 25 °C y al pH y a la concentración de sulfato de amonio indicada. Después de la centrifugación, el contenido de FcR en el sobrenadante se determinó midiendo la DO₂₈₀ y se representó frente a la concentración de sulfato de amonio.

25

SECUENCIAS

30

Las siguientes secuencias proporcionan una visión de conjunto de las secuencias usadas en el presente documento:

SEQ ID No: 1 (en el presente documento también denominadas en ocasiones „ variante 3")

```
MAPPKAVLKL EPQWINVLQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW FHNGNLIPTH TQPSYRFKAN
NNDSGEYTCQ TGQTSLSDPV HLTVLSEWL V LQTPHLEFQE GETIVLRCHS WKDKPLVKVT
35 PFQNGKSKKF SRSDPNFSP IP QANSHSGDY HCTGNIGYTL YSSKPVTITV QAPSSSP
```

SEQ ID No: 2

```
APPKAVLKLE PQWINVLQED SVTLTCRGTH SPESDSIQWF HNGNLIPTHT QPSYRFKANN
NDSGEYTCQT GQTSLSDPVH LTVLSEWLVL QTPHLEFQEG ETIVLRCHSW KDKPLVKVTF
40 FQNGKSKKFS RSDPNFSP IP Q ANSHSGDYH CTGNIGYTLY SSKPVTITVQ APSSSP
```

SEQ ID No: 3

```
PPKAVLKLEP QWINVLQEDS VTLTCRGTHS PESDSIQWFH NGNLIPTHTQ PSYRFKANNN
DSGEYTCQTG QTSLSDPVHL TVLSEWLVLQ TPHLEFQEGET TIVLRCHSWK DKPLVKVTF
45 QNGKSKKFSR SDPNFSP IP Q ANSHSGDYHC TGNIGYTLYS SKPVTITVQA PSSSP
```

SEQ ID No: 4

```
PKAVLKLEPQ WINVLQEDSV TLTTCRGTHSP ESDSIQWFHN GNLIPTHTQP SYRFKANNND
SGEYTCQTGQ TSLSDPVHLT VLSEWLVLQT PHLEFQEGET IVLRCHSWKD KPLVKVTF
50 NGKSKKFSRS DPNFSP IP Q AN HSGDYHCT GNIGYTLYSS KPVTITVQAP SSSP
```

SEQ ID No: 5

```
AVLKLEPQWI NVLQEDSVTL TCRGTHSPES DSIQWFHNGN LIPTHTQPSY RFKANNND
EYTCQTGQTS LSDFVHLTVL SEWLVLQTPH LEFQEGETIV LRCHSWKDKP LVKVTFFQ
55 KSKKFSRSDP NFSIPQANHS HSGDYHCTGN IGYTLYSSKP VTITVQAPSS SP
```

SEQ ID No: 6

```
atggcaccgc cgaagcagt tctgaaactg gaaccgcagt ggattaacgt tctgcaggaa
gatagcgta ccctgacctg tctgtggcacc catagcccgg aaagcgatag cattcagtg
ttcacacaacg gcaatctgat tccgacctat acccagccga gctatcgttt taaagcgaac
aacaacgata gcggcgaata tacctgtcag accggtcaga ccagcctgag cgatccgggt
catctgaccg ttctgagcga atggctgggt ctgcagacc cgcctctgga atttcaggaa
ggcgaaacca ttgttctgcg ttgccacagc tggaaagata aaccgctgggt taaagttacc
ttcttccaga acggcaaaag caaaaaattc agccgtagcg atccgaattt tagcattccg
caggcgaatc atagccatag cggcgattat cattgtaccg gcaacattgg ctataccctg
tatagcagca aaccgggtgac cattaccggt caggcgccga gcagcagccc gtaa
```

- 5 SEQ ID NO: 7 (en el presente documento también denominada en ocasiones „ variante 1", esta secuencia se desvela como SEQ ID NO: 1 en el documento WO 03/043648)

```
MAVLKLEPQW INVLOEDSVT LTRGRTHSPE SDSIQWFHNG NLIPTHTQPS YRFKANNND
GEYTCQTGQT SLSDPVHLTV LSEWLVLTLP HLEFQEGETI VLRCHSWKDK PLVKVTFQ
GKSKKFSRSD PNFSIPQANH SHSGDYHCTG NIGYTLYSSK PVTITV
```

- 10 SEQ 8 (en el presente documento también denominada en ocasiones „ variante 2", esta secuencia se desvela como SEQ ID NO: 3 en el documento WO 00/32767)

```
MGTPAAPPKA VLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
FKANNNDSGE YTCQTGQTSL SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIVL RCHSWKDKPL
VKVTFQNGK SKKFSRSDPN FSIPQANHS SHSGDYHCTGNI GYTLYSSKPV TITVQAPSS
PMGII
```

- 15 SEQ ID 9 (en el presente documento también denominada en ocasiones „ variante 4")

```
MTPAAPPKAV LKLEPQWINV LQEDSVTLTC RGTHSPESDS IQWFHNGNLI PTHTQPSYRF
KANNNDSGEY TCQTGQTSLS DPVHLTVLSE WLVLQTPHLE FQEGETIVLR CHSWKDKPLV
KVTFQNGKS KKFSDPNF SIPQANHS SHSGDYHCTGNIG YTLYSSKPV ITVQAPSSSP
MGI
```

Descripción detallada de la invención

- 20 Se debe indicar que, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "uno(a)", "el" y "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y a métodos equivalentes conocidos por los expertos habituales en la materia que se podrían
- 25 modificar o sustituir por los métodos que se describen en el presente documento.

Todas las publicaciones y patentes citadas en la presente divulgación se incorporan por referencia en su totalidad. En la medida en el que el material incorporado por referencia contradiga o sea incoherente con la presente memoria descriptiva, la memoria descriptiva reemplazará a cualquier material de ese tipo.

- 30 A menos que se indique de otro modo, se debe entender que la expresión "al menos" precediendo a una serie de elementos se refiere a cualquier elemento en la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de comprobar, usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención que se describe en el presente documento. Tales equivalentes pretenden estar incluidos por la presente
- 35 invención.

- En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que el término "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados pero
- 40 no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se usa en el presente documento, el término "que comprende" se puede sustituir con el término "que contiene" o en ocasiones cuando se usa en el presente documento con el término "que tiene".

- 45 Cuando en el presente documento se usa "que consiste en" excluye a cualquier elemento, etapa un ingrediente no especificado en el elemento reivindicado. Cuando se usan el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no influyan de forma material en las características básicas y nuevas de la

reivindicación.

En el presente documento, en cada caso, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se pueden sustituir con cualquiera de los otras dos expresiones.

5 En toda la presente memoria descriptiva se citan varios documentos. Cada uno de los documentos citados en el presente documento (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sea anteriormente posteriormente, se incorporan por la presente por referencia en su totalidad. Nada de lo contenido en el presente documento se debe interpretar como
10 una admisión de que la invención no da derecho a anticipar tal divulgación en virtud de la invención anterior.

15 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 1.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" o "secuencia de ácidos nucleicos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas de ADN/ARN híbridas, y
20 análogos de moléculas de ADN o ARN. Los análogos de este tipo se pueden generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótido, que incluyen, pero no se limitan a, inosina o bases de tritiladas. Los análogos de este tipo también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden estructuras principales modificadas que prestan atributos beneficiosos a las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a nucleasas o un aumento de la capacidad para cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser de una
25 hebra, de doble hebra, pueden contener porciones tanto de una hebra como de dos hebras, y pueden contener porciones de tres hebras, pero preferentemente es ADN de dos hebras.

En el ADN y el ARN se puede realizar una diversidad de modificaciones; por lo tanto, la expresión "moléculas de ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos" incluye formas modificadas por vía química, enzimática, o
30 metabólica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden modificar después de la traducción o después de la transcripción.

La secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención codifica la proteína de SEQ ID NO: 1. La secuencia del polipéptido codificado por SEQ ID NO: 1 se puede modificar debido a modificaciones después de la traducción o
35 después de la transcripción, dependiendo de la célula hospedadora que expresa el polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 1.

Cuando en el presente documento se usa "proteína de SEQ ID NO: X", con X siendo 1, 2, 3, 4, 5, o 9, se hace referencia a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada o como se representa en la SEQ ID
40 NO: X, con X siendo 1, 2, 3, 4, 5 o 9.

El término "polipéptido" o "proteína", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un péptido, una proteína, o un polipéptido, que se usan indistintamente y que incluye cadenas de aminoácidos de una longitud dada, en las que los restos de aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes. Sin embargo, los
45 peptidomiméticos de tales proteínas/polipéptidos en los que el aminoácido o aminoácidos y/o en la figura enlaces peptídicos se han reemplazado con análogos funcionales también están incluidos por la invención así como otros además de los 20 aminoácidos codificados genéticamente, tales como selenocisteína. Péptidos, oligopéptidos y proteínas se pueden denominar polipéptidos. Como se ha mencionado, a menudo los términos polipéptido y proteína se usan indistintamente en el presente documento. El término polipéptido también se refiere a, y no excluye,
50 modificaciones del polipéptido. Las modificaciones incluyen glicosilación, acetilación, acilación, fosforilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfotidilinositol, unión cruzada, ciclado, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de uniones cruzadas covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación,
55 procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por ARN de transferencia tal como arginilación, y ubiquitinación; véase, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983), pgs. 1-12; Seifter, Meth. Enzymol. 182 (1990); 626-646, Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992); 48-62.

Las proteínas de la presente invención se muestran en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 9. Por lo tanto, la presente invención proporciona proteínas mostradas en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 9.
65

El término "expresión" o "expresión de una secuencia de ácidos nucleicos" se refiere la transcripción de un ácido

nucleico específico o construcción genética específica. El término "expresión" o "expresión de ácido nucleico" en particular se refiere a la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos o construcción genética tal como un vector que comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 en ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARNm con o sin posterior traducción del último en una proteína. Preferentemente, la proteína se traduce a continuación. El proceso incluye la transcripción de ADN y procesamiento del producto de ARNm resultante. A continuación, el ARNm se traducen cadenas polipeptídicas, que por último se pliegan en los polipéptidos/proteínas finales. Los investigadores de proteómica usan comúnmente la expresión de proteínas para indicar la medición de la presencia y abundancia de una o más proteínas en una célula o tejido en particular. La expresión de una proteína de una célula se puede medir mediante diversos medios. Por ejemplo, con inmunohistoquímica o análisis de transferencia de Western. En el presente documento, los resultados obtenidos se pueden evaluar mediante una gran célula transfectada con un vector que comprende un ácido nucleico de la presente invención en comparación con una célula transfectada de forma simulada. Una célula con una expresión más elevada (hospedadora) muestra una tinción, que aumenta por ejemplo en intensidad, cuando se compara con una célula de control (simulada) en el mismo entorno. Además, la expresión del ARNm se puede medir por ejemplo mediante RT-PCR. El experto en la materia conoce diferentes técnicas, cómo determinar la expresión de una cierta proteína o ARNm de una célula. También se conciben proteínas, obtenidas debido a modificaciones después de la transcripción o después de la traducción.

Una "variante" de un polipéptido incluye un polipéptido en el que se sustituyen uno o más restos de aminoácidos, preferentemente sustituido de forma conservativa en comparación con dicho polipéptido y en el que dicha variante es capaz preferentemente de unirse a la parte Fc de los anticuerpos (véase la unión de of FcγR) y posiblemente a linfocitos. Las variantes de este tipo incluyen deleciones, inserciones, inversiones, repeticiones, y sustituciones seleccionadas de acuerdo con las reglas generales conocidas en la técnica. Por ejemplo, en Bowie, Science 247: (1990) 1306-1310 se proporciona una directriz con respecto a cómo preparar sustituciones de aminoácido fenotípicamente silencioso, en la que los autores indican que hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia al cambio de una secuencia de aminoácidos. Las variantes preferentes de FcγRIIB se muestran en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 9, siendo preferente FcγRIIB que se muestra en la SEQ ID NO: 1.

La expresión "receptor Fc gamma" se usa en el presente documento indistintamente con "FcγR" o "receptor Fcγ" o "FcγR" y comprende tanto FcγRs membranosos FcγRs como solubles (es decir, la parte extracelular de un receptor Fcγ). Los receptores Fc gamma pertenecen a la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas y se encuentran en muchos linajes hematopoyéticos. Como su nombre indica, los receptores Fc reconocen y se unen a la parte de Fc (fragmento, cristalizante) de anticuerpos, es decir, el fragmento que corresponde a los dos dominios C-terminales de ambas cadenas pesadas del anticuerpo y por lo general interactúa con moléculas y células efectoras.

Es preferente que la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 sea un FcγR soluble. De forma análoga, es preferente de la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, o 9 sea un FcγR soluble. También es preferente que una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 9 sea como tal soluble en un líquido adecuado, tal como un líquido acuoso.

Los FcγRs reconocen anticuerpos de IgG. En seres humanos existen cuatro subclases de IgG, nombradas en orden de su abundancia en el suero (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, con IgG 1 siendo el tipo de IgG más abundante). En seres humanos existen tres clases de FcγRs: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIIIA (CD16). Además, los FcγRs se producen en diversas isoformas, es decir, receptores Fc gamma funcionalmente similares que tienen una secuencia de aminoácidos similar pero no una idéntica. Dichas isoformas incluyen FcγRIA, B1, B2, C; FcγRIIA1-2, B1-3, C y, además, varios alelos (FcγRIIA1-HR, -LR; FcγRIIb-NA1,-NA2) (van de Winkel y Capel, Immunol. Today 1993, 14: 215-221). Las diferentes clases e isoformas de FcγR pueden diferir con respecto a su afinidad hacia IgG y de forma específica hacia las diferentes subclases de IgG. Por lo general, FcγR se produce como proteínas trans membrana de tipo I o en formas solubles pero también existe una forma del FcγRIII (FcγRIIIB) anclada a glicosilfosfatidilinositol.

Los "FcγRs solubles" también se denominan "sFcγRs". Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor Fcγ soluble" y expresiones análogas se refieren a la parte extracelular del receptor Fcγ. Tal parte se puede disolver en un líquido. En general, las formas solubles de cualquier clase, isoforma o alelo de FcγR se pueden identificar mediante una "s" precedente, por ejemplo, sCD32 o sFcγRII se refiere al receptor Fc gamma RII soluble. Por lo general, a diferencia del FcγR membranosos (es decir, unido a membrana), el FcγR soluble no comprende una región transmembrana o una cola intracitoplasmática.

Preferentemente, el FcγR de la invención es de origen humano o un FcγR humano. La expresión "de origen humano" se debe interpretar en su sentido más amplio. En general, se refiere a que un FcγR (o una región o fragmento del mismo) se parece o es similar a un FcγR humano (es decir, la proteína encontrada en el cuerpo humano) en términos de secuencia y/o estructura de aminoácido.

Como alternativa, el FcγR "de origen humano" puede ser un FcγR recombinante que se obtiene mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante en una célula hospedadora, por ejemplo como lo describen Sondermann y Jacob (1999), Bioll. Chem. 380 (6), 717-721. En resumen, un gen de interés se obtiene a partir de un organismo y se introduce en un vector, por ejemplo un plásmido o un virus, que a continuación se usa para transferir el gen en una célula hospedadora que expresa el gen recombinante y produce un producto de proteína

recombinante. El experto en la materia sabrá rápidamente qué célula hospedadora seleccionar para obtener un FcyR que sea, por ejemplo, adecuado para la preparación de una composición farmacéutica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede desear un FcyR no glicosilado. El experto en la materia puede seleccionar después una célula hospedadora procariota para la expresión del FcyR que está desprovisto de la maquinaria enzimática necesaria para la glicosilación de proteínas. En una realización los FcyRs se pueden expresar en procariotas y posteriormente purificar y volver a plegar de acuerdo con la descripción del documento of WO 00/32767.

En otra realización los FcyRs se pueden producir de forma fácil y barata con una pureza elevada en sistemas de expresión eucariota. Los sistemas útiles incluyen eucariotas con un aparato especializado para la producción de proteínas extracelulares, por ejemplo linfocitos B. Otros sistemas de expresión eucariota posibles incluyen, pero no se limitan a, células CHO o HEK. Por lo tanto, dicho FcyR soluble es FcyR recombinante, soluble y glicosilado.

En el presente documento los FcyRs como se ha mencionado incluyen adicionalmente FcyRs que, en comparación con el FcyR de tipo silvestre, se han modificado o alterado con respecto a la secuencia de aminoácidos, e incluyen, por ejemplo, sitios de glicosilación adicionales similares. Sin embargo, también se conciben formas no glicosiladas de FcyRs y son una realización preferente de FcyRs.

El receptor Fcy de la presente invención comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 (secuencia de aminoácidos de SM101, también denominada variante 3 en el presente documento). El FcyR de la presente invención está codificado por al menos una de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6 (secuencia de ácidos nucleicos que codifica SM101, también denominada variante 3 en el presente documento). Estas secuencias se pueden clonar en un vector de expresión para producir el FcyR correspondiente mediante expresión recombinante.

La presente invención también se refiere a un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Un vector de este tipo pueden ser, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado por ejemplo de forma convencional en ingeniería genética, y puede comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permitan la selección y/o replicación de dicho vector en una célula hospedadora adecuada y en condiciones adecuadas. En una realización preferente, dicho vector es un vector de expresión, en el que la molécula de ácido nucleico de la presente invención se une de forma operativa y la secuencia o secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células hospedadoras procariotas o eucariotas como se describe en el presente documento. La expresión "unido de forma operativa", como se usa en el presente contexto, se refiere a una unión entre una o más secuencias de control de la expresión y la región codificante en el polinucleótido a expresar de un modo tal que la expresión se consigue en condiciones compatibles con la secuencia de control de la expresión.

Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden insertar en varios vectores disponibles en el mercado. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores de plásmido compatibles con células de mamífero, tales como pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen), pREP (Invitrogen), pCRTopo (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMCl neo (Stratagene), pXTI (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pUCTag, pIZD35, pLXIN y pSIR (Clontech) y pIRES-EGFP (Clontech). Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se insertan en el vector "pET" bajo el control del Promotor T7 inducible por IPTG. Los vectores de baculovirus tales como pBlueBac, Sistema de Expresión de Baculovirus BacPacz (CLONTECH), y Sistema de Expresión de Baculovirus MaxBacTM, células de insecto y protocolos (Invitrogen) están disponibles en el mercado y también se pueden usar para producir altos rendimientos de proteína biológicamente activa. (Véase también, Miller (1993), Curr. Op. Genet. Dev., 3, 9; O'Reilly, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, p. 127). Además, los vectores procariotas tales como pcDNA2; y vectores de levadura tales como pYes2 son ejemplos no limitantes de otros vectores adecuados para su uso con la presente invención.

Otros vectores de expresión preferentes de la presente solicitud son aquellos para expresar proteínas en células de Drosophila que se conocen bien en la técnica, tales como la serie DES2 de Invitrogen. Preferentemente, dicho vector de expresión celular de Drosophila es pMTBiP/V5-His B (Invitrogen). El vector pMT/BiP/V5-His ofrece las siguientes características adicionales. Tiene un tamaño pequeño (3,6 kb) para mejorar los rendimientos de ADN y aumentar la eficacia de subclonación, tiene una etiqueta de epítipo V5 C-terminal para detección rápida con Anticuerpo Anti-V5 y tiene una etiqueta 6xHis C-terminal para purificación simple de proteínas de fusión recombinantes que usan una resina quelante de níquel.

Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel (2001), loc. cit. Los vectores pueden contener uno o más sistemas de replicación y herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores para selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

Las secuencias codificantes insertadas en el vector se pueden sintetizar mediante métodos convencionales, aislado a partir de fuentes naturales, o preparados como híbridos. La ligación de las secuencias codificantes a elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores, y/o aislantes) y/o a otras secuencias que codifican aminoácidos se puede realizar usando métodos establecidos.

Además, los vectores pueden comprender, además de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, elementos de control de expresión, que permiten la expresión apropiada de las regiones codificantes en hospedadores adecuados. Tales elementos de control son conocidos por el experto en la materia y pueden incluir un promotor, un codón de inicio de la traducción, un sitio de traducción e inserción o sitios de entrada ribosómicos internos (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) para introducir una inserción en el vector. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está unida de forma operativa a dichas secuencias de control de la expresión permitiendo la expresión en células eucariotas o procariotas.

Los elementos de control que aseguran la expresión en células eucariotas y procariotas son bien conocidos por los expertos en la materia. Como se ha mencionado anteriormente, normalmente comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente las señales poli-A asegurando la terminación de la transcripción y la estabilización de la transcripción. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción, así como potenciadores de la traducción, y/o regiones del promotor asociadas de forma natural o heterólogas. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión por ejemplo en células hospedadoras de mamífero comprenden el promotor de CMV-HSV de timidina quinasa, SV40, promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), promotor del factor 1 alfa de elongación humano, potenciador de CMV, promotor de CaM-quinasa o potenciador de SV40.

Para la expresión en células procariotas, se ha descrito una multitud de promotores que incluyen, por ejemplo, el promotor tac-lac, el promotor lacUV5 o el promotor trp. Junto a elementos que son responsables del inicio de la transcripción, tales elementos reguladores pueden comprender también señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, cadena abajo del polinucleótido. En este contexto, se conocen vectores de expresión adecuados en la técnica tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg, pcDVI, (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-Vitrogene, como se usa, entre otros en los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) r pGEMHE (Promega), o vectores de expresión procariotas, tales como lambda gt11.

Un vector de expresión con la presente invención es al menos capaz de dirigir la replicación, y preferentemente la expresión, de los ácidos nucleicos y proteína de la presente invención. Los orígenes de replicación adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación del Col E1, el virus SV40 y del M13. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de lacZ, el promotor de gal10 y el promotor poliédrico del virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). Las secuencias de terminación adecuadas incluyen, por ejemplo, la hormona de crecimiento bovino, SV40, lacZ y señales de poliadenilación poliédrica de AcMNPV. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen neomicina, ampicilina, y resistencia a higromicina y similares, preferentemente kanamicina. Los vectores diseñados de forma específica permiten el transporte de ADN entre diferentes células hospedadoras, tales como células de bacterias-levaduras, o bacterias-animales, o células de bacterias-fúngicas, o células de bacterias e invertebrados.

Además de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, el vector puede comprender adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican señales de secreción. Tales secuencias señal de secreción son muy conocidas por el experto en la materia. Además, dependiendo del sistema de expresión usado se pueden añadir secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido expresado a un compartimento a la secuencia codificante de las moléculas de ácido nucleico de la invención y son bien conocidas en la técnica. La secuencia o secuencias líder (se ensambla o ensamblan en una fase apropiada con secuencias de traducción, inicio y terminación, y preferentemente una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de proteína traducida, por una parte de la misma, a, entre otros, la membrana extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C- o N-terminal que imparte características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y, si se desea, puede seguir la recogida y purificación de las proteínas, fragmentos antigénicos o proteínas de fusión de la invención. Por supuesto, el vector el también puede comprender regiones reguladoras de organismos patógenos.

El vector puede ser preferentemente un vector de expresión inducible por ejemplo, un vector inducible por IPTG.

Además, dicho vector también puede ser, además de un vector de expresión, un vector de transferencia genética y/o de orientación genética. La terapia genética, que se basa en la introducción de genes terapéuticos (por ejemplo para vacunación) en células mediante técnicas *ex vivo* o *in vivo*, es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia genética. Los vectores, sistemas de vector y métodos adecuados para terapia genética *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y son conocidos por el experto en la materia; véase, por ejemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; documento WO 94/29469; documento WO 97/00957; Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640 o Verma, Nature 389 (1997), 239-242 y referencias citadas en ese documento.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención y los vectores como se ha descrito anteriormente en el presente documento anteriormente se pueden diseñar para introducción directa o para introducción a través de liposomas, o

vectores virales (por ejemplo, adenoviral, retroviral) en la célula. Además, se pueden usar sistemas de baculovirus o sistemas basados en virus *Vaccinia* o Virus del bosque de Semliki como sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico de la invención. Además de la producción recombinante, se pueden producir fragmentos de la proteína, proteína de fusión o fragmentos antigénicos de la invención mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida (véase Stewart *et al.*, 1969), Freeman Co, San Francisco Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2154). La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar usando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Diversos fragmentos se pueden sintetizar por vía química por separado y se pueden combinar usando métodos químicos para producir la molécula de longitud completa.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o el vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

Dicho "hospedador", se puede producir introduciendo dicho vector o secuencia de nucleótidos en una célula hospedadora que después de su presencia en la célula media la expresión de una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención o que comprende una secuencia de nucleótidos o un vector de acuerdo con la invención en el que la secuencia de nucleótidos y/o el polipéptido codificado es extraño para la célula hospedadora. El término "hospedador", cuando se usa en el presente documento, incluye células hospedadoras.

Por "extraño" se hace referencia a que la secuencia de nucleótidos y/o el polipéptido codificado es heterólogo con respecto al hospedador, esto se refiere a que se obtiene a partir de una célula un organismo con un antecedente genómico diferente, o es homólogo con respecto al hospedador pero está situado en un entorno genómico diferente al del homólogo de origen natural de dicha secuencia de nucleótidos. Esto significa que, si la secuencia de nucleótidos es homóloga con respecto al hospedador, no está situada en su posición natural en el genoma de dicho hospedador, en particular está rodeada por diferentes genes. En este caso, la secuencia de nucleótidos puede estar bajo el control de su propio promotor o bajo el control de un promotor heterólogo. La posición de la molécula de ácido nucleico o el vector introducidos puede determinarla el experto en la materia usando métodos muy conocidos para el experto en la materia, por ejemplo, Transferencia de Southern. El vector o secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención que está presente en el hospedador se puede integrar en el genoma del hospedador o se puede mantener en alguna forma por vía extracromosómica. En este sentido, también se debe entender que la secuencia de nucleótidos de la invención se puede usar para restablecer o crear un gen mutante a través de recombinación homóloga.

En una realización, la célula hospedadora que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o el vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 es una célula hospedadora procariota o eucariota. Preferentemente, la célula hospedadora procariota es *E. coli*, más preferentemente BL21 de *E. coli*, tal como BL21 (DE3).

Las células procariotas/bacterianas adecuadas son aquellas que se usa por lo general para clonación similar a *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* o *Bacillus subtilis*. Dicho hospedador eucariota puede ser una células de mamífero, una célula de anfibio, una célula de pescado, una celular insecto, una célula fúngica, una célula vegetal o una célula bacteriana (por ejemplo, las cepas HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 y JM101 de *E. coli*). Las células hospedadoras recombinantes procariotas son preferentes, con *E. coli* siendo la más preferente.

Los ejemplos adicionales de células hospedadoras procariotas incluyen, pero no se limitan a, células de levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* o *Pichia pastoris*, líneas celulares de origen humano, bovino, porcino, mono, y roedor, así como células de insecto, que incluyen, pero no se limitan a, células de insecto de *Spodoptera frugiperda* y células de insecto obtenidas a partir de *Drosophila* así como células de pez cebra. Las líneas celulares obtenidas a partir de especies de mamíferos adecuadas para su uso y disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a, células L, células CV-1, células COS-1 (ATCC CRL 1650), células COS-7 (ATCC CRL 1651), células HeLa (ATCC CCL 2), células C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) y MRC-5 (ATCC CCL 171).

Dichas células obtenidas a partir de *Drosophila* pueden ser S2 de *Drosophila* (ATCC CRL-1963) que se usan, preferentemente, para expresión de proteína heteróloga en sistemas de expresión de *Drosophila*, por ejemplo, el Sistema de Expresión de *Drosophila* (DES®).

Las líneas celulares obtenidas a partir de especies de mamíferos adecuadas para su uso y disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a, células L, células CV-1, células COS-1 (ATCC CRL 1650), células COS-7 (ATCC CRL 1651), células HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26) y MRC-5 (ATCC CCL 171).

En otra realización más preferente, dicha célula de anfibio es un oocito. En una realización incluso más preferente dicho oocito es un oocito de rana, de forma particularmente preferente un oocito de *Xenopus laevis*.

En una realización más preferente, el hospedador de acuerdo con la invención es un organismo transgénico no humano. Dicho organismo no humano puede ser un mamífero, anfibio, un pescado, un insecto, uno hubo una planta. Los animales transgénicos no humanos particularmente precedentes son especies de *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, especies de *Xenopus*, pez cebra, *Spodoptera frugiperda*, *Autographa californica*, ratones y ratas. Las plantas transgénica comprenden, pero no se limitan a, trigo, tabaco, perejil y *Arabidopsis*.

En la técnica también se conocen bien los hongos transgénicos y comprenden, entre otros, levaduras tales como *S. pombe* o *S. cerevisiae*, o especies de *Aspergillus*, *Neurospora* o *Ustilago* o especies de *Pichia*.

La presente invención también se refiere a una proteína obtenida o que se puede obtener mediante la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o el vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 en una célula hospedadora, preferentemente una célula hospedadora procariota, más preferentemente en *E. coli*, lo más preferentemente en BL21 de *E. coli*, tal como BL21 de *E. coli* (D3).

En el presente documento se describen métodos para producir el polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de la invención que comprende cultivar/ reproducir el hospedador de la invención y aislar el polipéptido producido.

En la técnica existe un gran número de métodos adecuados para producir polipéptidos en hospedadoras apropiados. Si el hospedador es un organismo unicelular o una célula de mamífero o de insecto, el experto en la materia puede volver a una diversidad de condiciones de cultivo que se pueden optimizar adicionalmente sin una carga excesiva de trabajo. De forma conveniente, la proteína producida se cosecha a partir del medio de cultivo o a partir de cuerpos de inclusión aislados (biológicos) mediante técnicas establecidas. Además, el polipéptido producido se puede aislar directamente a partir de la célula hospedadora. Dicha célula hospedadora puede ser parte de o se puede obtener a partir de una parte de un organismo hospedador, por ejemplo dicha célula hospedadora debe ser parte del tejido, por ejemplo SNC, piel, etc., de un animal o la parte cosechable de una planta. Además, el polipéptido producido se puede aislar a partir de fluidos obtenidos a partir de dicho hospedador, tales como sangre, leche o líquido cefalorraquídeo.

Además la presente invención se refiere a polipéptidos que están codificados por la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 de la invención.

Por consiguiente con el polipéptido de la invención se puede producir mediante métodos microbiológicos o mediante mamíferos transgénicos. También se concibe que el polipéptido de la invención se recupere a partir de plantas transgénicas. Como alternativa, el polipéptido de la invención se puede producir por vía sintética o por vía semisintética.

Por ejemplo, se puede usar síntesis química, tal como el procedimiento en fase sólida descrito por Houghton Proc. Natl. Acad. Sci. USA (82) (1985), 5131-5135. Otro método es la traducción de ARNm *in vitro*. Un método preferente implica la producción recombinante de proteína en células hospedadoras como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que comprende en toda o una parte de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención se pueden sintetizar mediante PCR, se pueden insertar en un vector de expresión, y una célula hospedadora transformada con el vector de expresión. A partir de ese momento, la célula hospedadora se cultiva para producir el polipéptido deseado, que se aísla y se purifica. El aislamiento y purificación de proteínas se puede conseguir mediante una cualquiera de varias técnicas conocidas; por ejemplo, y no limitado a ello, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por filtración en gel y cromatografía por afinidad, cromatografía líquida a alta presión (HPLC), HPLC en fase inversa, electroforesis preparativa en gel de disco. Además, para producir los polipéptidos de la presente invención se pueden usar sistemas de traducción sin células. Los sistemas de expresión sin células adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen lisado de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo, membranas microscópicas pancreáticas caninas, extracto de S30 de *E. coli*, sistemas de transcripción/traducción acoplados tales como el sistema TNT (Promega). Estos sistemas permiten la expresión de polipéptidos o péptidos recombinantes después de la adición de vectores de clonación, fragmentos de ADN, o secuencias de ARN que contienen regiones codificantes y elementos promotores apropiados. Como se ha mencionado anteriormente, las técnicas de aislamiento/purificación de proteínas pueden requerir la modificación de las proteínas de la presente invención usando métodos convencionales. Por ejemplo, una etiqueta de histidina se puede añadir a la proteína para permitir su purificación en una columna de níquel. Otras modificaciones pueden producir una actividad mayor o menor, pueden permitir niveles más elevados de producción de proteína, o pueden simplificar la purificación de la proteína. Otras etiquetas también incluyen la etiqueta flag. Tales etiquetas se usan preferentemente para hospedadores eucariotas.

La proteína de la presente invención tiene preferentemente la secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico de la presente invención como se describe en el presente documento o se obtiene o se puede obtener mediante la expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos que se describe en el presente documento. Como tal también se pueden usar vectores que comprenden la SEQ ID NO: 1 tales como por ejemplo, en vectores de expresión, para conseguir la expresión de una proteína obtenida o que se puede tener mediante la

expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1.

Por ejemplo, las cepas de BL21 de *E. coli* (DE3) se pueden usar para mediar la expresión de la proteína de SEQ ID NO: 1 o el vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. En la técnica se conoce la construcción de un vector por ejemplo a la expresión bajo el control del Promotor T7 inducible por IPTG inducible. Las células BL21 de *E. coli* (DE3) electrocompetentes se pueden transformar con ADN plásmido por ejemplo un vector de expresión como se ha descrito anteriormente. Las células procesadas a continuación se cultivan en medio. Después del cultivo, las células se cosechan mediante centrifugación o se pueden lisar directamente por ejemplo mediante sonicación y la suspensión se centrifuga o se trata a continuación como se ha ejemplificado en el ejemplo. El sedimento, es decir, los cuerpos de inclusión en bruto, se pueden volver a suspender a continuación en tampón por ejemplo tampón de crisis. Los cuerpos de inclusión húmedos se solubiliza a continuación. Después de otra centrifugación, se puede obtener la proteína de interés o antes de que la proteína se pueda volver a plegar por ejemplo como se ejemplifica en el ejemplo. La expresión de proteínas, interrupción celular, recuperación de cuerpos de inclusión, y nuevo plegamiento de cuerpos de inclusión por lo general se realiza como se sabe en la técnica y, por ejemplo, como se describe en el presente documento en los Ejemplos.

Una forma para purificar una proteína incluye precipitación con sulfato de amonio ya que se trata de un método usado para purificar proteínas mediante la alteración de su solubilidad. Es un caso específico de una técnica más general conocida como desalado. El sulfato de amonio se usa normalmente ya que su solubilidad es tan elevada que se permiten soluciones salinas con fuerza iónica elevada. La solubilidad de las proteínas varía de acuerdo con la fuerza iónica de la solución, y por lo tanto de acuerdo con la concentración de la sal. Se observan dos efectos distintos: a concentraciones de sal bajas, la solubilidad de la proteína aumenta con el aumento de la concentración de sal (es decir, aumentando la fuerza iónica), un efecto denominado salting in. A medida que la concentración de sal (fuerza iónica) aumenta adicionalmente, la solubilidad de la proteína comienza a disminuir. A una fuerza iónica suficientemente elevada, la proteína precipitará casi completamente de la solución (salting out).

Dado que las proteínas se diferencian notablemente en sus solubilidades a fuerza iónica elevada, el salting-out es un procedimiento muy útil para ayudar en la purificación de una proteína dada. Mediante la adición de sulfato de amonio cosmotrópico, los productos secundarios de plegamiento tales como especies no plegadas y con plegamiento erróneo y además impurezas obtenidas a partir de células hospedadoras tales como componentes de la pared celular y proteínas precipitan. Con un aumento de la concentración del agente precipitan, la eficacia de la precipitación aumentara y por lo tanto se obtiene una preparación de FcR altamente purificada siempre y cuando la variante de FcR sea resistente a la precipitación con tales concentraciones de sulfato de amonio elevadas. Por lo tanto, es deseable tener una variante de FcR que sea altamente soluble a concentraciones de sulfato de amonio iguales o incluso que superen 1,5 M.

A continuación, la proteína precipitada se retira por centrifugación y a continuación la concentración de sulfato de amonio aumenta hasta un valor que precipitara la mayor parte de la proteína de interés a la vez que deja la cantidad máxima de contaminantes de proteína todavía en solución. La proteína precipitada de interés se recupera mediante centrifugación y se disuelve en tampón recién preparado para la siguiente etapa de purificación.

Preferentemente, la proteína de la presente invención tiene una alta solubilidad en concentraciones de sulfato de amonio iguales o superiores a 1,5 M.

La presente invención también se refiere a una proteína que está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6.

Una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, o 9 se puede codificar con la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, en la que

(i) el primer codón (ATG) se omite de la SEQ ID NO: 6 que da como resultado una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 2,

(ii) el primer (ATG) y el segundo codón (GCA) se omiten de la SEQ ID NO: 6 que da como resultado una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 3,

(iii) el primer (ATG), segundo (GCA) y tercer codón (CCG) se omiten de la SEQ ID NO: 6 que da como resultado una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 4,

(iv) el primer (ATG), segundo (GCA), tercer (CCG), cuarto (CCG) y quinto (AAA) codón se omiten de la SEQ ID NO: 6 que da como resultado una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 5,

(v) los codones que codifican los aminoácidos TPA desde el extremo N- al C-Terminal se añaden entre el primer (ATG) y el segundo (GCA) codón a partir de la SEQ ID NO: 6 y los codones que codifican la secuencia de aminoácidos MGI se añaden en la posición 3' con respecto al penúltimo codón (CCG) de la SEQ ID NO: 6 que da como resultado una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 9.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína obtenida o que se puede obtener mediante la expresión del ácido nucleico que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o el vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o una proteína

codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6.

El término "composición", como se usa de acuerdo con la presente invención, se refiere a

- 5 (a) composición o composiciones que comprende(n) al menos una proteína obtenida o que se puede obtener mediante la expresión del ácido nucleico que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1;
- (b) o el vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o 9;
- 10 (c) o una proteína codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6;
- (d) o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 9.

- 15 Se concibe que las composiciones de la presente invención que se describen a continuación en el presente documento comprendan las proteínas mencionadas anteriormente en cualquier combinación. Opcionalmente, puede comprender moléculas adicionales que sean capaces de unirse a otras proteínas por ejemplo anticuerpos o linfocitos. La composición puede estar en forma sólida, líquida o gaseosa y puede estar, entre otros, en forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) solución o soluciones, (un) aerosol(es), gránulos, píldoras, suspensiones, emulsiones, cápsulas, jarabes, líquidos, elixires, extractos, tintura o extractos fluidos en una forma que sea particularmente adecuada para administración oral o parental o tópica.
- 20

Otra composición preferente de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende además opcionalmente un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica comprende, entre otros, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención o el polipéptido de la presente invención que se puede acoplar a un polipéptido adicional, por ejemplo un anticuerpo u otra proteína presente en el suero.

25

La composición farmacéutica se puede administrar con un vehículo fisiológicamente aceptable a un paciente, como se describe en el presente documento. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

30

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. El agua es un vehículo preferente cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden usar como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables.

35

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, ion sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulgentes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similar. La composición se puede formular como un supositorio, con tradicionales y vehículos aglutinantes tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como las calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Las composiciones de este tipo contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos mencionados anteriormente, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma adecuada de administración al sujeto. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

40

45

50

En otra realización preferente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina tales como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Por lo general, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Por lo general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo seco liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o una bolsita indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

55

60

65

La composición farmacéutica de la invención se puede formular como formas neutras o de sal. Las sales

farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los obtenidos a partir de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, ácido tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los obtenidos a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

5 Los ensayos *in vitro* se pueden usar opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se usará en la formulación también dependerá de la vía de la administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y se debería decidir de acuerdo con el criterio del experto en medicina y las circunstancias de cada sujeto. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta
10 obtenidas a partir de sistemas de ensayo de modelo *in vitro* o animal. Preferentemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante.

La composición farmacéutica se puede diseñar para la aplicación en terapia genética. La técnica de terapia genética ya se ha descrito anteriormente en relación con las células hospedadoras de la invención y todo lo que se ha dicho
15 también se aplica en relación con la composición farmacéutica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico o la proteína que comprende la proteína obtenida o que se puede obtener mediante la expresión del ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o el vector que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o una proteína codificada por la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6 en la composición farmacéutica está preferentemente en una forma que permita su introducción, expresión y/o integración estable en células de un
20 sujeto individual a tratar.

Para terapia genética, se pueden usar diversos vectores virales que pueden usar, por ejemplo, adenovirus, virus del herpes, vaccinia o, preferentemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único gen extraño, incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de
25 Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Un número de vectores retrovirales adicionales también pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que las células transducidas se puedan identificar y generar. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos de la diana insertando, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un azúcar, un glicolípido, o una
30 proteína. Los expertos en la materia sabrán de, o pueden averiguar fácilmente sin excesiva experimentación, las secuencias de polinucleótidos específicas que se pueden insertar en el genoma retroviral para permitir la administración específica de diana del vector retroviral que contiene la secuencia de polinucleótidos insertada.

Dado que los retrovirus recombinantes son preferentemente defectuosos, estos requieren asistencia para producir partículas vectoriales infecciosas. Esta ayuda se puede proporcionar, por ejemplo, usando líneas de células auxiliares que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras dentro de la LTR. A estos plásmidos les falta una secuencia de nucleótidos que permite al mecanismo de empaquetamiento para reconocer una transcripción de ARN para la encapsulación. Las líneas de células auxiliares que tienen deleciones de la señal de empaquetamiento incluyen, pero no se limitan a w2, PA317 y
40 PA12, por ejemplo. Estas líneas celulares producen viriones vacíos, ya que no se empaqueta ningún genoma. Si se introduce un vector retroviral en tales células en las que la señal de empaquetamiento está intacta, pero los genes estructurales están sustituidos por otros genes de interés, el vector se puede empaquetar y producir el virión vector. Como alternativa, las células NIH 3T3 u otras células de cultivo tisular se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. Estas células se transfectan a continuación con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo. Otro sistema de administración dirigido para las moléculas de ácido nucleico de la presente invención es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferente de la presente invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que las vesículas unilamelares grandes (LUV), cuyo tamaño varía de 0,2-4,0 µm pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. Además de las células de mamífero, se han usado liposomas para la administración de polinucleótidos en células de plantas, levaduras y bacterianas. Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia genética eficaz, deberían estar presentes las siguientes características: (1) encapsulación de los genes de interés con alta eficacia sin comprometer su actividad biológica; (Mannino, *et al.*, Biotechniques, 6: 682, 1988). La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, en particular fosfolípidos de alta temperatura de transición de fase, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los diacilfosfatidilgliceroles son particularmente útiles, en los que el resto lipídico contiene de 14-18 átomos de carbono, en particular de 16-18 átomos de carbono, y está saturado. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. La orientación de los liposomas se puede clasificar basándose en factores anatómicos y mecánicos. La clasificación anatómica se basa en el nivel de selectividad, por ejemplo,
55
60
65

específica de órgano, específica de célula y específica de orgánulo. La orientación mecánica se puede distinguir en función de si es pasiva o activa. La orientación pasiva usa la tendencia natural de los liposomas para distribuirse a las células del sistema reticuloendotelial (RES) en órganos que contienen capilares sinusoidales.

5 En el contexto de la presente invención el término "sujeto" se refiere a un individuo que necesita un tratamiento de un trastorno afectivo. Preferentemente, el sujeto es un vertebrado, incluso más preferente un mamífero, particularmente preferente un ser humano. En una realización, el ser humano es un paciente o un individuo.

10 El término "administrado" se refiere a la administración de una dosis terapéutica o diagnósticamente eficaz de la molécula de ácido nucleico mencionada anteriormente que codifica el polipéptido de la presente invención a un individuo.

15 Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del componente o agente terapéutico activo que es suficiente para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno, retrasar el inicio de una enfermedad o proporcionar cualquier beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de una enfermedad.

20 Como se sabe en la técnica y se ha descrito anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para la administración sistémica con respecto a la localizada, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y no podrán establecer los expertos en la materia con la experimentación de rutina. Los métodos se pueden aplicar tanto en terapia humana como en aplicaciones veterinarias. Los compuestos descritos en el presente documento que tienen la actividad terapéutica deseada se pueden administrar a un paciente en un vehículo fisiológicamente aceptable, como se describe en el presente documento. Dependiendo de la forma de introducción, los compuestos se pueden formular en una diversidad de formas como se discute a continuación. La concentración de compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar en aproximadamente un 0,1-100 %. Los agentes se pueden administrar solos o en combinación con otros tratamientos.

30 La administración de la composición farmacéutica se puede realizar de diversas maneras como se ha discutido anteriormente, que incluyen, pero no se limitan a, por vía oral, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intranodal, intramedular, intratecal, intraventricular, intranasal, intrabronquial, transdérmica, intranodal, intrarrectal, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular. En algunos casos, por ejemplo, en el tratamiento de heridas e inflamación, los agentes candidatos se pueden aplicar directamente como una solución de pulverización seca.

35 Preferentemente la composición farmacéutica se inyecta. Esta inyección se administra usando infusiones intravenosas, por vía subcutánea o intramuscular. Además, la composición farmacéutica puede comprender otros vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

40 Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede distribuir con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección, de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración. Además, la composición farmacéutica se puede administrar en combinación con uno u otros agentes o anticuerpos terapéuticos más, tales como esteroides o inmunoglobulina intravenosa, en particular corticosteroides, profármacos glucocorticoides, por ejemplo prednisona, IVIG, anti-D, alcaloides de la vinca, por ejemplo vincristina o vinblastina, danazol, agentes inmunosupresores, por ejemplo azatioprina, ciclofosfamida o ciclosporina A, dapsona, agentes trombotopoyéticos, rituximab, micofenolato mofetilo, romiplostim, eltrombopag, micofenolato mofetilo. Como se usa en el presente documento, la expresión "en combinación" se refiere al uso de más de un agente profiláctico y/o terapéutico. El uso de la expresión "en combinación" no limita el orden en que se administran los agentes profilácticos y/o terapéuticos a un paciente.

55 El médico asistente y los factores clínicos determinarán el régimen de dosificación. Como es bien sabido en las artes médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto en particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se están administrando de forma simultánea. Una dosis habitual puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo a modo de ejemplo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente.

60 Las dosificaciones se administran preferentemente una vez a la semana, sin embargo, durante la evolución del tratamiento, las dosificaciones se pueden administrar en intervalos de tiempo mucho más largos y si hubiera necesidad se pueden administrar en intervalos de tiempo mucho más cortos, por ejemplo, diariamente. En un caso precedente, la respuesta inmunitaria se controla usando métodos que se describen en el presente documento y métodos adicionales conocidos por los expertos en la materia y las dosificaciones se optimizan, por ejemplo, en tiempo, cantidad y/o composición. Las dosificaciones variarán pero una dosificación preferente para administración intravenosa de ADN es de aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de ADN. Si el régimen es una infusión

continua, también debería estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. La evolución se puede controlar mediante una evaluación periódica. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por vía local o por vía sistemática. La administración será preferentemente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de ion sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa e ion sodio, solución de Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen sustituyentes de líquidos y nutrientes, sustituyentes de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

También se prevé que las composiciones farmacéuticas se usen en enfoques de coterapia con otros agentes, por ejemplo, útiles para detectar ADN metilado y, por lo tanto, útiles para diagnosticar neoplasias que pueden mostrar un patrón metilado típico.

La presente invención proporciona kits que se pueden usar para los métodos descritos anteriormente. Un experto en la materia también sabe bien que la composición farmacéutica puede estar en forma de un kit de dosificación múltiple que contiene cantidades suficientes de dosis de administración de FcγR para tratar o prevenir de forma eficaz enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunes en un paciente. En una realización, el envase o kit farmacéutico comprende uno o más envases llenos con la composición farmacéutica de la invención. Además, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales útiles para el tratamiento de una enfermedad también se pueden incluir en el envase o kit farmacéutico.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para el tratamiento y prevención de trastornos o enfermedades.

Como se usa en el presente documento, el término "que trata" y términos análogos se refieren a una gestión y cuidado de un paciente y/o el combate de una enfermedad o trastorno. Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refiere la prevención de la aparición o inicio de uno o más síntomas un trastorno en un sujeto que resulta de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se usa en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente para hacer referencia a una afección en un sujeto. En particular, la expresión "enfermedad autoinmune" se usa indistintamente con la expresión "trastorno autoinmune" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracteriza la por lesión de células, tejidos y/u órganos causada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. La expresión "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con la expresión "trastorno inflamatorio" para hacer referencia a una afección en un sujeto caracteriza la por inflamación, preferentemente inflamación crónica. Los trastornos autoinmunes pueden estar o no asociados con inflamación. Además, la inflamación puede o no estar causada por un trastorno autoinmune. Por lo tanto, ciertos trastornos se pueden caracterizar como trastornos tanto autoinmunes como inflamatorios.

En una realización preferente, la enfermedad inflamatoria que se puede tratar con el presente método es Trombocitopenia Inmune Primaria (TIP), Lupus Sistémico Eritematoso Sistémico (LES), Artritis Reumatoide (AR) o Anemia Hemolítica Autoinmune (AHAI).

La presente invención también se refiere a una composición de materia que comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 y/o 3.

El término "composición de materia" se refiere a todas las composiciones de dos o más sustancias y a todas las sustancias compuestas, tanto si son el resultado de unión química, o de mezcla mecánica, o un producto biológico. Una composición de materia se puede formar mediante la mezcla de dos o más ingredientes. La mezcla de ingredientes en una composición de materia se puede producir mediante operaciones mecánicas o químicas o mediante procesos biológicos.

La composición de materia puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más principios activos. Con "principio activo" se hace referencia a un ingrediente terapéuticamente eficaz. Un principio activo de este tipo se puede unir a los anticuerpos de IgG como se describe en el presente documento y posiblemente se puede unir a linfocitos, por ejemplo linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales. Un principio activo de este tipo solo se une a la región constante. En una composición de materia es preferente que una proteína de la presente invención sea el único principio activo como se ha descrito anteriormente.

En una realización la composición de materia comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 y 3. En otra realización la composición de materia comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 o 3. En otra realización la composición de materia comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2. En otra realización la composición de materia comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 3.

En una realización la composición de materia de la presente invención comprende adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 4 y/o 5. En otra realización la composición de materia de la presente invención comprende adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 4 y 5. En otra realización la composición de materia de la presente invención comprende adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 4 o 5.

5 En otra realización la composición de materia de la presente invención comprende adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 4. En otra realización la composición de materia de la presente invención comprende adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 5.

10 En otra realización la composición de materia de la presente invención se caracteriza por que la cantidad de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 3.

En otra realización la composición de materia de la presente invención se caracteriza por que la cantidad de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 3 supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2.

15 En otra realización la composición de materia de la presente invención se caracteriza por que la cantidad de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 3 y la cantidad de las proteínas de acuerdo con la SEQ ID No: 2 y 3 supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 4 y/o 5.

20 En una realización la composición de materia comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 9.

La composición de materia es, en una realización preferente, una composición farmacéutica.

25 La presente invención también se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica que comprende cultivar la célula hospedadora de la presente invención en condiciones que permitan la expresión de la proteína codificada, y recuperar la composición farmacéutica obtenida.

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Estos ejemplos no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la presente invención. Los ejemplos se incluyen para fines de ilustración y la presente invención está limitada solamente por las reivindicaciones.

Materiales y Métodos

35 Producción de variantes de FcR

Se inocularon 75 ml de LB suplementado con 50 µg/ml de Kanamicina en un matraz cónico con tabique deflector de 250 ml con 5 µl de una solución de reserva de glicerol y se agitó durante 15 h a 37 °C, 170 rpm (Multitron Standard, Infors HT). Posteriormente, se inoculó 1 l de LB en un matraz cónico con tabique deflector de 2 l con 10 ml del cultivo durante una noche culture y se agitó a 37 °C, 170 rpm. A una DO₆₀₀ de 1,6, la expresión se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM. Después del cultivo durante otras 3 h a 37 °C, 170 rpm, las células se cosecharon mediante centrifugación (10 min a 5.000 g, 4 °C), se lavaron una vez con 200 ml de PBS enfriado con hielo y se almacenaron a -20 °C.

45 Interrupción celular y aislamiento de cuerpos de inclusión

Se descongelaron 6 - 8 g de células de *E. coli* congeladas a temperatura ambiente y se volvieron a suspender en 30 ml de tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM, NaCl 25 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) suplementado con 100 µg/ml de lisozima usando un homogeneizador de teflón en vidrio. Después de incubación durante 15 min en hielo, las células se interrumpieron mediante sonicación (ajuste de potencia en 6, ciclo de tareas al 30 %, 30 min, Sonicador 250 equipado con una micropunta, Branson) y la suspensión se centrifugó (45 min a 13.000 g, 4 °C). Se tomaron muestras de 1 ml del sobrenadante y el líquido restante se descartó. El sedimento, es decir, los cuerpos de inclusión en bruto, se volvieron a suspender en 35 ml de tampón de lisis suplementado con un 0,5 % (v/v) de Polisorbato 20 usando un homogeneizador de teflón en vidrio y se centrifugó (15 min a 13.000 g, 4 °C). Después de una etapa de lavado adicional con detergente, se realizó una etapa de lavado final usando tampón de lisis solo. Los cuerpos de inclusión lavados se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

60 Rplegamiento y purificación de variantes de FcR

Los cuerpos de inclusión húmedos se solubilizaron a 200 mg/ml en Tris/HCl 20 mM, guanidina 6 M, EDTA 3 mM, DTT 5 mM, pH 8,0 durante 2,5 h a 20 °C con agitación constante (400 rpm) en un tubo de centrifugadora cerrado. Después de la centrifugación (20.000 g, 10 min, 20 °C) del sobrenadante se recogió por decantación y el contenido de FcR se determinó después de una dilución a 1:60 con RP-HPLC en Knauer Bioselect C4. Basándose en los resultados analíticos, los cuerpos de inclusión solubilizados se diluyeron con Tris/HCl 20 mM, guanidina 6 M, EDTA 3 mM, DTT 5 mM, pH 8,0 hasta un contenido de FcR de 21 mg/ml y una parte de la solución diluida de FcR se

añadió gota a gota a 20 partes de tampón de replegamiento agitado (800 rpm) (Tris/HCl 20 mM, urea 2 M, arginina 0,5 M, cisteamina 2 mM, cistamina 2 mM, pH 7,7 a 6 °C). Después de incubación durante 16 h a 10 °C en un recipiente sellado sin agitación, la solución de replegamiento se calentó a temperatura ambiente. La solución de replegamiento caliente se ajustó a (NH₄)₂SO₄ 1,1 M mediante la adición gota a gota de (NH₄)₂SO₄ 3,5 M, NH₄H₂PO₄ 20 mM, pH 7,0 con agitación constante (400 rpm). Después de agitar durante otra 1 h a 200 rpm la suspensión se centrifugó (20.000 g, 20 min, 20 °C), el sobrenadante se filtró (0,2 µm de Durapore®, Millipore) y el filtrado se cargó a 4 ml/min, ≤ 4 mg de proteína/ml de resina sobre una columna de Fenil Sepharose HP de 35 ml (h = 6,6 cm, d = 2,6 cm, GE Healthcare) equilibrada en (NH₄)₂SO₄ 1,2 M, NH₄H₂PO₄ 20 mM, pH 7,0. La columna se lavó con 100 ml de (NH₄)₂SO₄ 1,2 M, NH₄H₂PO₄ 20 mM, pH 7,0 y la proteína unida se eluyó con 350 ml de gradiente lineal de (NH₄)₂SO₄ de 1, 2 M a 0 M en NH₄H₂PO₄ 20 mM, pH 7,0 a 5 ml/min. El eluato se recogió en fracciones de 7,5 ml, que se sometieron a análisis de RP-HPLC en Phenomenex Jupiter C4. Las fracciones con una pureza superior a un 85 % con respecto a la variante de FcR buscará a continuación se combinaron, se concentraron aprox. dos veces y diafiltraron frente a L-histidina 20 mM a pH 6,5 mediante filtración de flujo tangencial (Vivaflow 50, 5 kDa de MWCO, 0,01 m², flujo cruzado de 200 ml/min, pIN = 200 kPa; Sartorius) hasta que la conductividad se redujo a aprox. 5 mS/cm. Después de intercambiar el tampón la solución se cargó a 2 ml/min, ≤ 20 mg de proteína/ml de resina sobre una columna de SP Sepharose HP de 9 ml (h = 4,5 cm, d = 1,6 cm, GE Healthcare) equilibrada en L-histidina 20 mM, pH 6,5. La columna se lavó con 30 ml de L-histidina 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,5 y la proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de 90 ml de NaCl de 20 mM a 400 mM en 20 mM L-histidina, pH 6,5 a 3 ml/min. Las fracciones que comprendían el pico principal se combinaron, se ajustaron a 15,4 mS/cm con L-histidina 20 mM a pH 6,5, se concentraron a aprox. 20 mg/ml mediante ultrafiltración (4.000 g, 5 kDa de MWCO, Vivaspin 20, Sartorius) y se diluyeron a 15 mg/ml con L-histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5. La solución de FcR diluida se filtró (0,45 µm de membrana de PES, Puradisc™ 25 mm, Whatman) se tomaron alícuotas, se congeló de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

25 Identificación Sistemática de Precipitación

El FcR se ajustó a 0,7 mg/ml en presencia de histidina 20 mM, NaCl 150 mM y sulfato de amonio 0 - 2,8 M mediante la adición de la cantidad apropiada de ddH₂O, 10X de solución de reserva de histidina/NaCl (histidina 20 mM, NaCl 1,5 M) y solución de reserva de sulfato de amonio (4 M en ddH₂O). El pH se ajustó a 6, 7 o 8 usando una solución de reserva de 10X de histidina/NaCl y sulfato de amonio con el pH apropiado. Cada condición se ajustó por duplicado. Las muestras se incubaron durante 1 h a 25 °C, se centrifugaron (20.000 x g, 10 min) y se transfirieron 30 µl del sobrenadante a una placa de 384 pocillos (µtransparente, sin unión, de color negro, Greiner Bio-one). La absorbancia a 280 nm se midió (Spectrofluor plus, Tecan) y el contenido de proteína se calculó de acuerdo con la Ley de Lambert Beer usando un coeficiente de extinción de masa de 1,5625 ml x mg⁻¹ x cm⁻¹ y una longitud de paso de 0,24 cm. La absorbancia de un pocillo de muestra se corrigió mediante la absorbancia de un pocillo que contenía solamente tampón de blanco.

SDS page

Para moderar el posterior intercambio de disulfuro, los tioles libres se alquilaron con yodoacetamida mezclando 18 µl de IBs solubilizado o caldo de cultivo de replegamiento con 2 µl de yodoacetamida 250 mM recién preparada en H₂O. La mezcla se incubó durante 45 min a 30 °C, 750 rpm en la oscuridad y se usó directamente para la preparación de muestras por SDS-PAGE de acuerdo con el manual de NuPAGE® Novex® (Invitrogen). Las proteínas se separaron en un gel de Bis-Tris al 4-12 % en tampón de desarrollo MES (ambos de NuPAGE® Novex®, invitrogen) de acuerdo con los insurgentes del fabricante. Los geles se lavaron tres veces con ddH₂O y se tiñeron con Tinción Segura Simply Blue™ (Invitrogen) durante al menos 6 h a temperatura ambiente. Como marcador molecular se aplicaron 10 µl de patrón pre-tinción SeeBlue® Plus2 (Invitrogen).

LC-MS

La masa molecular de la proteína intacta expresada se determinó mediante espectrometría de masas en colaboración con el MPI de Bioquímica (Martinsried). Las muestras se analizaron en un analizador de masas ESI-TOF (microTOF, Bruker) equipado con una columna Phenomenex Aeris™ Widepore C4 (100 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula de 3,6 µm, tamaño de poro de 300 Å) previamente equilibrada en acetonitrilo al 30 %, TFA al 0,05 %. Las muestras que contenían FcR se inyectaron a 0,25 ml/min, 20 °C y la proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de 15 min de acetonitrilo de un 30% a un 80%, TFA al 0,05 %.

Espectroscopía de UV/VIS

Si fuera necesario, la solución de proteína se diluía con el respectivo tampón a una DO₂₈₀ entre 0,2 y 0,8. Se transfirieron 400 µl de la solución a una microcubeta de UV-micro (UV-micro cubeta, Brand). La absorbancia a 280 nm y 320 nm se registró (TidasE, J&M Analytik) y la concentración de proteína en mg/ml se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$c_{\text{proteína}} = (DO_{280} - DO_{320}) \times 0,64 \text{ mg/ml}$$

Como blanco se usó el respectivo tampón. El ensayo se realizó por triplicado y se hizo un promedio de los resultados.

5

Ejemplo 1: Identificación sistemática de precipitación

La preparación de la proteína de FcR mediante un proceso basado en replegamiento normalmente implica una etapa de precipitación con sulfato de amonio. Mediante la adición de sulfato de amonio cosmotrópico precipitan productos secundarios como especies sin plegar y con plegamiento erróneo y además con impurezas obtenidas a partir de célula hospedadora tales como componentes de la pared celular y proteínas. Con el aumento de la concentración del agente precipitante, la eficacia de la precipitación aumentada y por lo tanto se obtiene una preparación de FcR altamente purificada siempre y cuando la variante de siempre y cuando la proteína de interés sea resistente a la precipitación a concentraciones tan altas de sulfato de amonio. Por lo tanto, es deseable tener una variante de FcR que sea altamente soluble a concentraciones de sulfato de amonio iguales o superiores a 1,5 M. además de la precipitación directa de impurezas, las concentraciones elevadas de sulfato de amonio facilitarán una unión eficaz a una resina de HIC. Dado que una capacidad de unión dinámica alta siempre es una diana de desarrollo fundamental para una etapa de captura cromatográfica, la solubilidad en presencia de concentraciones elevadas de sulfato de amonio es obligatoria.

20

Para evaluar la solubilidad de las variantes de FcR en presencia de sulfato de amonio, cada variante se incubó con concentraciones crecientes de sulfato de amonio a pH de 6 a 8. Después de 1 hora a 25 °C, la concentración de FcR en el sobrenadante se determinó mediante espectroscopía de UV/vis. Como se muestra en la Figura 2, la variante 3 está más resistente a la precipitación con sulfato de amonio con una precipitación semimáxima de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 2,05 M a 2,13 M. Por el contrario, la "variante 2" (SEQ ID NO: 8) y la "variante 4" (SEQ ID NO: 9) son menos solubles a concentraciones elevadas de sulfato de amonio, lo que muestra una precipitación semimáxima a concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el intervalo de 1,70 M - 1,76 M. sin embargo, la "variante 4" todavía es soluble a una concentración elevada de sulfato de amonio. La dependencia del pH de la solubilidad era insignificante para todas las variantes de FcR.

30

Obsérvese que no es posible el realizar una identificación sistemática de precipitación y, por lo tanto, determinar la solubilidad de la "variante 1" en concentraciones elevadas de sulfato de amonio, dado que la "variante 1" no se repliega suficientemente y, por lo tanto, no se puede obtener proteína soluble para la identificación sistemática de precipitación.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Supremol GmbH

40

<120> Variantes de receptor Fc gamma IIB

<130> SUP14715PCT

<150> US13/663.527

45

<151> 30-10-2012

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> artificial

55

<220>

<223> Variante de receptor Fc gamma IIB

<400> 1

60

ES 2 628 049 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser
 165 170 175

Pro

- <210> 2
- 5 <211> 176
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- 10 <223> Variante de receptor Fc gamma IIB
- <400> 2

ES 2 628 049 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
 165 170 175

<210> 3
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Variante de receptor Fc gamma IIB

<400> 3

ES 2 628 049 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
 165 170

<210> 5
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Variante de receptor Fc gamma IIB

10

<400> 5

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

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

ES 2 628 049 T3

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

Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys
 50 55 60

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

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

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

Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser
 115 120 125

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

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

Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
 165 170

<210> 6
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Variante de receptor Fc gamma IIB

<400> 6

atggcaccgc cgaaagcagt tctgaaactg gaaccgcagt ggattaacgt tctgcaggaa 60
 gatagcgtta ccctgacctg tcgtggcacc catagcccgg aaagcgatag cattcagtgg 120
 tttcacaacg gcaatctgat tccgacctat acccagccga gctatcgttt taaagogaac 180
 aacaacgata gggcgaata tacctgtcag accggtcaga ccagcctgag cgatccggtt 240
 catctgaccg ttctgagcga atggctgggt ctgcagacc cgcactctgga atttcaggaa 300
 ggcgaacca ttgttctgcg ttgccacagc tggaagata aaccgctggt taaagttacc 360
 ttcttcaga acggcaaaag caaaaaattc agccgtagcg atccgaattt tagcattccg 420
 caggcgaatc atagccatag cggcgattat cattgtaccg gcaacattgg ctataacctg 480
 tatagcagca aaccggtgac cattaccggt caggcgccga gcagcagccc gtaa 534

ES 2 628 049 T3

5 <210> 7
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Variante de receptor Fc gamma IIB

10 <400> 7

```

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
          115          120          125

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

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

Pro Val Thr Ile Thr Val
          165
  
```

15 <210> 8
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Variante de receptor Fc gamma IIB

20

ES 2 628 049 T3

<400> 8

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

Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys
 100 105 110

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

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

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

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

Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile
 180 185

5

<210> 9
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Variante de receptor Fc gamma IIB

15

<400> 9

ES 2 628 049 T3

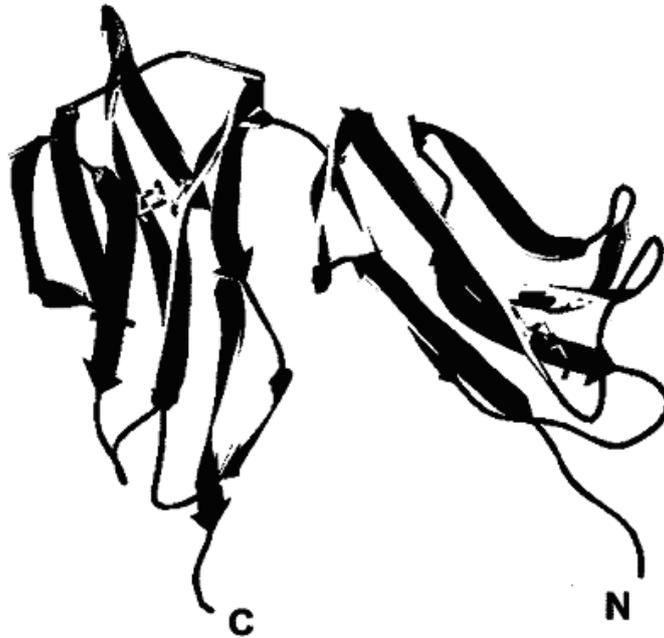
Met Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln
1 5 10 15
Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly
20 25 30
Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn
35 40 45
Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn
50 55 60
Asn Asp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

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 1.
- 5 2. Un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 1.
3. Una proteína obtenida mediante la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 1 o el vector de la reivindicación 2 en una célula hospedadora.
- 10 4. La proteína de la reivindicación 3, en la que la célula hospedadora es una célula hospedadora procariota.
5. La proteína de la reivindicación 3 o 4, en la que la célula hospedadora es *E. coli*.
- 15 6. Una proteína que está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6.
7. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de la reivindicación 3 o 4.
8. Una composición de materia que comprende una proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 y/o 3.
- 20 9. La composición de materia de la reivindicación 8 que comprende adicionalmente una proteína de acuerdo con la SEQ ID No. 4 y/o 5.
10. La composición de materia de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que la cantidad de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 2 supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 3.
- 25 11. La composición de materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la cantidad de las proteínas de acuerdo con la SEQ ID No: 2 y 3 supera a la de la proteína de acuerdo con la SEQ ID No: 4 y/o 5.
- 30 12. Una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 1 o el vector de la reivindicación 2.
13. La célula hospedadora de la reivindicación 12, que es una célula hospedadora procariota o eucariota.
- 35 14. La célula hospedadora procariota de la reivindicación 13, que es *E. coli*, preferentemente BL21 de *E. coli*.
15. Un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en condiciones que permitan la expresión de la proteína codificada, y recuperar la composición farmacéutica obtenida.
- 40

FIGURA 1

a)



b)

Sec. 7: "var. 1"	-----MAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
Sec. 8: "var. 2"	MGTPAAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
Sec. 1: "var. 3"	----MAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR
Sec. 9: "var. 4"	-MTPAAPPKAVLKLEPQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYR

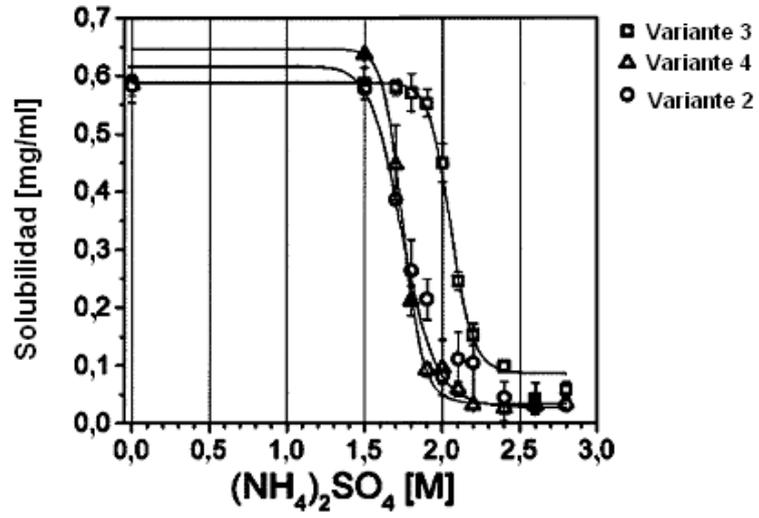
Sec. 7: "var. 1"	FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLLVLESEWLVLPQPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
Sec. 8: "var. 2"	FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLLVLESEWLVLPQPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
Sec. 1: "var. 3"	FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLLVLESEWLVLPQPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL
Sec. 9: "var. 4"	FKANNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLLVLESEWLVLPQPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPL

Sec. 7: "var. 1"	VKVTFFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVTITV-----
Sec. 8: "var. 2"	VKVTFFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVTITVQAPSSS
Sec. 1: "var. 3"	VKVTFFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVTITVQAPSSS
Sec. 9: "var. 4"	VKVTFFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVTITVQAPSSS

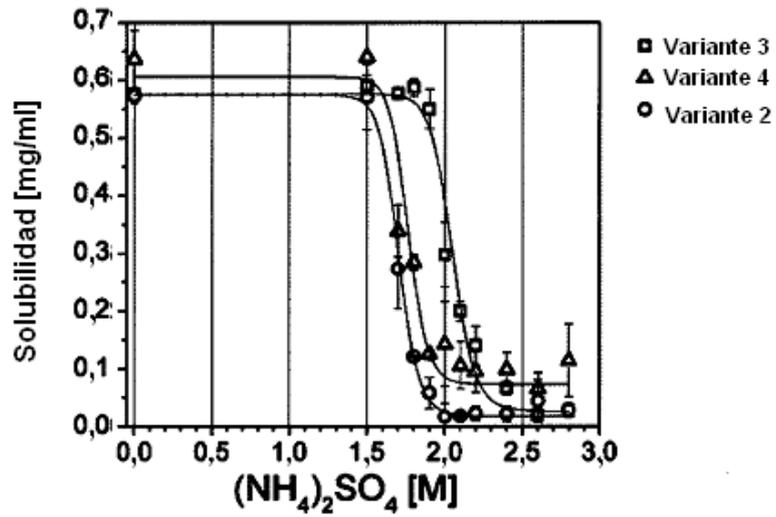
Sec. 7: "var. 1"	-----
Sec. 8: "var. 2"	PMGII
Sec. 1: "var. 3"	P----
Sec. 9: "var. 4"	PMGI-

FIGURA 2

pH 6



pH 7



pH 8

