

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 894**

51 Int. Cl.:

C12N 15/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2013 PCT/EP2013/066096**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020069**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2013 E 13744530 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2880169**

54 Título: **Procedimiento para producir moléculas monoméricas y multiméricas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

02.08.2012 EP 12179021

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

25.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AUER, JOHANNES;
BADER, MARTIN;
DENGL, STEFAN;
LORENZ, STEFAN y
SEEBER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 633 894 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

Procedimiento para producir moléculas monoméricas y multiméricas y usos de las mismas

5 En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de moléculas monoméricas y multiméricas como polipéptido de fusión con una región Fc de inmunoglobulina y sus usos, tales como un agente terapéutico, en ensayos, columnas de cromatografía o generación de modelos animales de enfermedad.

Antecedentes de la invención

10

Una inmunoglobulina contiene en general dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas polipeptídicas pesadas. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras comprende una región variable (generalmente la porción aminoterminal de la cadena polipeptídica) que contiene un dominio de unión que es capaz de interactuar con un antígeno. Cada una de las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras también comprende una región constante (generalmente la parte carboxiterminal). La región constante de la cadena pesada media la unión de la inmunoglobulina, por ejemplo, con células que portan un receptor Fc gamma (FcγR), tales como células fagocíticas, o con células que portan el receptor Fc neonatal (FcRn) también conocido como receptor Brambell y también media la unión a algunos factores incluyendo factores del sistema clásico del complemento tales como el componente (C1q).

15

20

Hulett y Hogarth (Hulett, MD y Hogarth, PM, Adv. Immunol. 57 (1994) 1-127) informaron de que los receptores extracelulares para la parte Fc de las inmunoglobulinas de clase G son una familia de glicoproteínas transmembrana que comprenden tres tipos de receptores diferentes que tienen diferente especificidad de unión: FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Los receptores de tipo I interactúan con IgG que no está en forma de complejo, mientras que los receptores de tipo II y III interactúan preferiblemente con IgG que está en forma de complejo.

25

Ciertas proteínas de fusión de citocinas basadas en inmunoglobulinas están comercialmente disponibles (por ejemplo, en Biomol). Sobre las fusiones de la región Fc se informa, en general, en «Therapeutic monoclonal antibodies – from bench to clinic» (Wiley, Edited by Zhiqiang An, 2009).

30

En el documento WO 01/03737 se informa de proteínas de fusión de inmunoglobulinas. Gillies, SD, et al., informan de una semivida en circulación mejorada y la eficacia de una inmunocitocina de anticuerpo-interleucina 2 basada en una proteólisis intracelular reducida. (Clin. Cancer Res. 8 (2002) 210-216). Dumont, JA, et al. (Biodrugs 20 (2006) 151 - 160) informan de fusiones Fc monoméricas. Sobre la expresión de alto nivel y la secreción de proteínas de fusión Fc-X en células de mamífero se informa en Lo, KM., Et al. (Prot. Eng. 11 (1998) 495-500). En el documento WO 00/40615 se informa de la expresión y exportación de proteínas antiobesidad como proteínas de fusión Fc.

35

Sumario de la invención

40

Se ha encontrado que los polipéptidos, que son biológicamente activos como n-mérico y forman agregados/multímeros no definidos tras la expresión, se pueden obtener en forma soluble expresando estos polipéptidos como polipéptido de fusión con una región Fc que no se une sustancialmente a un receptor Fc. El uso de un polipéptido de fusión para la expresión del polipéptido aumenta el rendimiento obtenible del polipéptido ya sea en forma del polipéptido de fusión o como polipéptido aislado. Se ha encontrado además que el polipéptido permanece en una forma n-mérica definida después de la escisión y la eliminación de la región Fc.

45

En el presente documento se describe un procedimiento para la producción de un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada que comprende las siguientes etapas

50

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I



en la que

55

B designa un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

60

FC denota un polipéptido de la región Fc de cadena pesada, CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

65

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

5 en la que $u = 1$ o 2 ,

en la que FC no se une sustancialmente a un receptor Fc.

b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,

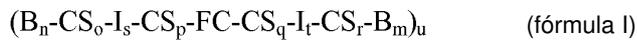
10

c) opcionalmente escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,

y producir de este modo un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada.

15

En el presente documento se informa de un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I



20

en la que B denota un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC denota un polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

25

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

30

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

35

en la que $u = 1$ o 2 ,

en la que FC no se une sustancialmente a un receptor Fc.

40

Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para la producción de un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada que comprende las siguientes etapas

45

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II



en la que

50

B designa un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC^1 denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

55

FC^2 indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

60

en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

65

en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

en la que FC^1 y FC^2 están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro (:),

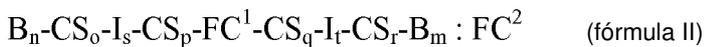
en la que FC^1 y FC^2 no se unen sustancialmente a un receptor Fc,

b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,

c) escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,

y producir de este modo un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada.

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



en la que

B designa un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC^1 denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

FC^2 indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

en la que el primer FC y el segundo FC están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro,

en la que FC^1 y FC^2 no se unen sustancialmente a un receptor Fc.

En el presente documento se informa de un polipéptido n-mérico obtenido por escisión de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento, obtenido mediante un procedimiento de acuerdo con el procedimiento como se informa en el presente documento.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un polipéptido 2-mérico o 3-mérico obtenido por un procedimiento como se informa en el presente documento.

En un modo de realización B se selecciona del grupo de grupo de citocinas como IL17, IL18 e IL33, de receptores de citocinas como IL18R e IL33R, de miembros de la familia de TNF como TNF, TWEAK y TL1a.

En un modo de realización, FC es una variante de un polipéptido de cadena pesada seleccionado del grupo de polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG2 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG3 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG1 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG2a murina, polipéptido de cadena pesada de IgG3 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG de conejo. Esto incluye todos los alotipos de origen natural.

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

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

En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene una o más de las mutaciones de aminoácidos E233P, L234A, L235A, L235E, ΔG236, D265A, N297A, N297D, P329A, P329G y P331S.

5 En un modo de realización, el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene las mutaciones de aminoácidos L234A y L235A y uno o más de E233P, L235E, ΔG236, D265A, N297A, N297D, P329A, P329G y P331S.

En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene las mutaciones de aminoácidos L234A y L235A y P329A o P329G.

10 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG2 humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 233, 234, 235, 236, 265 y 329.

15 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 228, 235, 265 y 329.

En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana tiene una o más de las mutaciones S228P, L235E, D265A, P329A y P329G.

20 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana tiene las mutaciones S228P y L235E y P329A o P329G.

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

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

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

40 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana que tiene una unión reducida a FcRn tiene las mutaciones de aminoácidos 1253A, H310A y H435A.

En un ejemplo $u = 2$ y el primer FC comprende la mutación T366W y opcionalmente la mutación S354C y el segundo FC comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V y opcionalmente la mutación Y349C.

40 En un ejemplo $u = 2$ y

a) $n = 1$ y $m = 0$ y B fusionados al primer FC y B fusionado al segundo FC son idénticos, o

45 B) $n = 1$ y $m = 0$ y B fusionados al primer FC y B fusionado al segundo FC son diferentes, o

C) $n = 0$ y $m = 1$ y B fusionados al primer FC y B fusionado al segundo FC son idénticos, o

50 D) $n = 0$ y $m = 1$ y B fusionados al primer FC y B fusionado al segundo FC son diferentes.

El polipéptido de fusión comprende un segundo FC enlazado por disulfuro, en el que un FC comprende la mutación T366W y opcionalmente la mutación S354C y el otro FC comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V y opcionalmente la mutación Y349C.

55 En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un polipéptido que es biológicamente activo como 1-mérico (monómero) y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada y comprende las siguientes etapas

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II

60 $B_n-CS_o-I_s-CS_p-FC^1-CS_q-I_t-CS_r-B_m : FC^2$ (fórmula II)

en la que

65 B designa un polipéptido que es biológicamente activo como 1-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC¹ denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,
 FC² indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,
 5 CS denota un sitio de escisión e
 I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,
 10 en la que n = 1 y m = 0, o n = 0 y m = 1,
 en la que si n = 1 entonces o = 0 o 1, y si o = 0 entonces p = 0 o 1, y si o = 1 entonces p = 0 y s = 0 o 1 y q = 0 y t = 0 y r = 0,
 15 en la que si m = 1 entonces q = 0 o 1, y si q = 0 entonces r = 0 o 1, y si q = 1 entonces r = 0 y t = 0 o 1 y o = 0 y s = 0, y p = 0,
 en la que FC¹ y FC² están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro (:),
 20 en la que FC¹ y FC² no se unen sustancialmente a un receptor Fc,
 b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,
 c) opcionalmente escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,
 25 y producir de este modo un polipéptido que es biológicamente activo como 1-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada.
 En un aspecto el procedimiento como se informa en el presente documento es para la producción de un polipéptido que
 30 es biológicamente activo como 2-mérico (dímero) y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada y comprende las siguientes etapas
 a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II
 35
$$B_n-CS_o-I_s-CS_p-FC^1-CS_q-I_t-CS_r-B_m : FC^2 \quad (\text{fórmula II})$$
 en la que
 B designa un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la
 40 expresión en ausencia de una región Fc fusionada,
 FC¹ denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,
 FC² indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,
 45 CS denota un sitio de escisión e
 I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,
 50 en la que n = 1 y m = 0, o n = 0 y m = 1,
 en la que si n = 1 entonces o = 0 o 1, y si o = 0 entonces p = 0 o 1, y si o = 1 entonces p = 0 y s = 0 o 1 y q = 0 y t = 0 y r = 0,
 55 en la que si m = 1 entonces q = 0 o 1, y si q = 0 entonces r = 0 o 1, y si q = 1 entonces r = 0 y t = 0 o 1 y o = 0 y s = 0, y p = 0,
 en la que FC¹ y FC² están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro (:),
 60 en la que FC¹ y FC² no se unen sustancialmente a un receptor Fc,
 b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,
 c) opcionalmente escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,
 65 y producir de este modo un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico y forma agregados/multímeros no

definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada.

En un aspecto el procedimiento como se informa en el presente documento es para la producción de un polipéptido que es biológicamente activo como 3-mérico (trímero) y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada y comprende las siguientes etapas

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II

$$B_n-CS_o-I_s-CS_p-FC^1-CS_q-I_t-CS_r-B_m : FC^2 \quad (\text{fórmula II})$$

en la que

B designa un polipéptido que es biológicamente activo como 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC¹ denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

FC² indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

en la que n = 1 y m = 0, o n = 0 y m = 1,

en la que si n = 1 entonces o = 0 o 1, y si o = 0 entonces p = 0 o 1, y si o = 1 entonces p = 0 y s = 0 o 1 y q = 0 y t = 0 y r = 0,

en la que si m = 1 entonces q = 0 o 1, y si q = 0 entonces r = 0 o 1, y si q = 1 entonces r = 0 y t = 0 o 1 y o = 0 y s = 0, y p = 0,

en la que FC¹ y FC² están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro (:),

en la que FC¹ y FC² no se unen sustancialmente a un receptor Fc,

b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,

c) opcionalmente escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,

y producir de este modo un polipéptido que es biológicamente activo como 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada.

En un modo de realización la secuencia de aminoácidos intercalada se selecciona de un primer grupo que comprende (G₃S)₃, (G₃S)₄, (G₃S)₅, (G₃S)₆, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₅S)₂, (G₅S)₃, (G₅S)₄, y cualquier combinación de los mismos, o de un segundo grupo que comprende Arg-tag, Avi-tag, His-Avi-tag, His-tag, Flag-tag, 3xFlag-tag, Strep-tag, Nano-tag, SBP-tag, c-myc-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a la quitina, marcado GST o marcado MBP, o de las combinaciones de dos elementos de estos grupos.

En un modo de realización el sitio de escisión se selecciona entre el sitio de escisión de la proteasa de la proteasa de IgA, el sitio de escisión de la proteasa grancima B, el sitio de escisión de la proteasa Tev, el sitio de escisión de la proteasa PreScission, el sitio de escisión de la trombina, el sitio de la proteasa del factor 10a, el sitio de escisión de la proteasa Ides, el sitio de escisión de la enterocinasa o un sitio de escisión de la proteasa SUMO (U1p1 (proteasa 1 específica de Ubl) de *Saccharomyces cerevisiae*).

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

En un modo de realización se ha suprimido el residuo de lisina C-terminal en la(s) región(ones) FC. Esto reduce la cantidad de productos secundarios de la escisión de la proteasa (eliminación del sitio de escisión de la proteasa artificial).

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado como se informa en el presente documento o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento como ligando en cromatografía de afinidad.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión inmovilizado como se informa en el presente documento de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento en un inmunoensayo.

5 En un modo de realización el polipéptido de fusión o el polipéptido 2-mérico o 3-mérico se une a una fase sólida.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o un polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento.

10

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento en la fabricación de un medicamento.

15

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento como inmunógeno.

20

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento para obtener un modelo animal de una enfermedad mediante la aplicación del polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o el polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento a un animal experimental.

25

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico como se informa en el presente documento para seleccionar un anticuerpo que se une específicamente a B o un 2-mérico o 3-mérico de B.

30

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o de un polipéptido 2-mérico como se informa en el presente documento para producir un 2-mérico enlazado por disulfuro de B.

Descripción detallada de la invención

Descripción de las figuras

35

Figura 1 Mapa de plásmidos del plásmido de expresión del polipéptido de fusión con el receptor Fc.

Figura 2 Gel de SDS-PAGE analítico de la escisión de la papaína del polipéptido de fusión con el receptor Fc.

40

Figura 3 Gel Bis Tris al 12 % +/- DTT; escisión de FcgammaRIIIaV158-Avi-Fc LALA P239G con proteasa PreScission (carril 4, 8) respectivamente proteasa de IgA (carril 3, 7): se puede observar una escisión inespecífica con PP (carril 2, 6).

45

Figura 4 Separación y cuantificación de diferentes formas de glicosilación de un anticuerpo anti-Her (natural, en la parte superior) y un anticuerpo anti-Her diseñado por glicoingeniería.

Figura 5 Comparación de la columna de afinidad usando FcgammaRIIIaV158 y FcgammaRIIIaV 158 marcado con Fc.

50

Figura 6 El sensograma BIAcore de la respuesta del polipéptido de fusión FcgammaRIIIaV158-Fc LALA P329G muestra más de 100 unidades de respuesta en comparación con el FcgammaRIIIaV158 con 40 RU; FcRIIIa V 158_008 denota el polipéptido de fusión no escindido, FcRIIIa V 158_007 denota una variante no funcional acortada del FcRIIIa (= control), FcRIIIa V 158_jf323 denota el HisAvi-tag intacto que comprende la variante funcional de FcRIIIa.

55

Figura 7 Sensogramas del polipéptido de fusión V158-Fc LALA P329G (figura 7a), del receptor Fc gamma V158 (figura 7a), del receptor Fc gamma V158 (figura 7b), del polipéptido de fusión receptor de Fcgamma escindido V158-Fc LALA P329G (figura 7c), del polipéptido de fusión receptor Fcgamma no funcional V158-Fc LALA P329G (figura 7d) (= control).

60

Figura 8 Mapas de plásmidos de plásmidos de expresión de polipéptidos de fusión Fc-TWEAK.

Figura 9 Mapas de plásmidos de plásmidos de expresión de polipéptidos de fusión Fc-IL 17A.

Figura 10 Curvas de titulación de las variantes del TNF alfa humano.

65

Figura 11 Esquema de las diferentes configuraciones y estados de polipéptidos de fusión Fc IL17 diméricos.

Figura 12 Polipéptido de fusión TWEAK humano- región Fc trimérico.

Figura 13 Tanto las formas de longitud completa (1-270) como las cortas (112-270) de IL-33 son funcionalmente activas; se puede añadir IgG-Fc en lugar de resto (1-112) de IL-33 para obtener una IL-33 funcionalmente activa; actúa como un monómero; IgG1-Fc_IL-33 monomérico.

Figura 14 TNF alfa trimérico humano como polipéptido de fusión IgG1-Fc-KiH_sitio de proteasa Precision_shTNFa.

Figura 15 Mapa de plásmidos del plásmido de expresión del polipéptido de fusión Fc-shTNFalfa (botón).

Figura 16 Plásmido de expresión de la región Fc de la IgG1 (hueco) humana e el mapa de plásmidos.

Figura 17 Datos BIAcore del polipéptido de fusión IL18R-Fc monómero como se informa en el presente documento en comparación con el polipéptido de fusión IL18R-Fc dimérico.

Definiciones

El término «unión a un receptor Fc» denota la unión de una región Fc a un receptor Fc en, por ejemplo, un ensayo BIAcore^(R) (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia).

En el ensayo BIAcore^(R), el receptor Fc está unido a una superficie y la unión del analito, por ejemplo una región Fc que comprende el polipéptido de fusión o un anticuerpo, se mide por resonancia de plasmón superficial (SPR). La afinidad de la unión se define por los términos k_a (constante de asociación: constante de velocidad para la asociación del polipéptido de fusión o conjugado con la región Fc para formar un complejo de región Fc/receptor Fc), k_d (constante de disociación; constante de velocidad para la disociación del polipéptido de fusión o conjugado con la región Fc desde un complejo de región Fc/receptor Fc) y KD (k_d/k_a). De forma alternativa, la señal de unión de un sensograma de SPR puede compararse directamente con la señal de respuesta de una referencia, con respecto a la altura de la señal de resonancia y los comportamientos de disociación.

El término «dominio CH2» designa la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 231 a la posición EU 340 (sistema de numeración EU según Kabat). En un modo de realización un dominio CH2 tiene la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 01 (APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAK). El dominio CH2 es único porque no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificadas enlazadas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una región Fc nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206.

El término «dominio CH3» indica la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 341 a la posición EU 446. En un modo de realización un dominio CH3 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 02 (GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG).

El término «clase» de un anticuerpo denota el tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término «región Fc» denota la región C-terminal de una inmunoglobulina. La región Fc es una molécula dimérica que comprende dos polipéptidos de la región Fc de la cadena pesada del anticuerpo enlazado por disulfuro (cadenas polipeptídicas de la región Fc). Se puede generar una región Fc mediante digestión con papaína, o digestión con IdeS o digestión con tripsina de un anticuerpo intacto (de longitud completa) o puede producirse de forma recombinante.

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

La formación de la región Fc dimérica que comprende dos fragmentos de cadena pesada de anticuerpo idénticos o no idénticos está mediada por la dimerización no covalente de los dominios CH3 comprendidos (para los residuos de aminoácidos implicados véase, por ejemplo, Dall'Acqua, *Biochem.* 37 (1998) 9266-9273). La región Fc se estabiliza covalentemente mediante la formación de enlaces disulfuro en la región bisagra (véase, por ejemplo, Huber et al., *Nature* 264 (1976) 415-420; Thies et al., *J. Mol. Biol.* 293 (1999) 67-79). La introducción de cambios en los residuos de

aminoácidos dentro del dominio CH3 para interrumpir la dimerización de interacciones de dominios CH3-CH3 no afectan negativamente a la unión a FcRn vinculante debido a que las localizaciones de los residuos implicados en la dimerización de dominio CH3-CH3 se encuentran en la superficie interna del dominio CH3, mientras que los residuos implicados en la interacción de región Fc-FcRn están situados en el exterior del dominio CH2-CH3.

Las funciones efectoras asociadas a la región Fc se inician por la interacción de la región Fc con receptores de superficie celular específicos de funciones efectoras. En su mayor parte los anticuerpos del isotipo IgG1 pueden efectuar la activación de receptores, mientras que los anticuerpos del isotipo IgG2 e IgG4 no tienen función efectora o tienen una función efectora limitada.

Los receptores que desencadenan una función efectora son los tipos (y subtipos) del receptor Fc FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Las funciones efectoras asociadas con un isotipo IgG1 pueden reducirse introduciendo cambios de aminoácidos específicos en la región bisagra inferior, tales como L234A y/o L235A, que están implicados en la unión de FcγR y C1q. También ciertos residuos de aminoácidos, especialmente situados en el dominio CH2 y/o CH3, están asociados con la semivida circulante de una molécula de anticuerpo o un polipéptido de fusión con la región Fc en el torrente sanguíneo. La semivida en la circulación está determinada por la unión de la región Fc al receptor Fc neonatal (FcRn).

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

El término «región Fc de origen humano» denota la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina de origen humano que contiene al menos una parte de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. En un modo de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, puede estar presente o no lisina en el extremo C (Lys447) de la región Fc. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es acorde al sistema de numeración EU, también llamado el índice EU, como se describe en Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

El término «parte de unión a FcRn de una región Fc» denota la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se extiende aproximadamente desde la posición EU 243 a la posición EU 261 y aproximadamente desde la posición EU 275 a la posición EU 293 y aproximadamente desde la posición EU 302 a la posición EU 319 y aproximadamente de la posición EU 336 a la posición EU 348 y aproximadamente de la posición EU 367 a la posición EU 393 y la posición EU 408 y aproximadamente de la posición EU 424 a la posición EU 440. En un modo de realización uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos de acuerdo con la numeración EU de Kabat son F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P287, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439 y S440 (numeración EU).

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

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

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

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

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

5

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

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

10

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

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

15

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

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

20

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

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

25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25

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

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

5

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

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

10

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

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

15

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

El término «receptor Fc», abreviado a «FcR», denota un receptor que se une a una región Fc. En un modo de realización el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. Además, en un modo de realización, el FcR es un FcR que se une a un anticuerpo IgG (un receptor Fc gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas de forma alternativa de las mismas. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un «receptor activador») y FcγRIIB (un «receptor inhibidor»), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492, Capel, et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34, de Haas, et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341. Otros FcR están englobados en el presente documento por el término «FcR». El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (véase, por ejemplo, Guyer et al., *J. Immunol.* 117 (1976) 587; Kim, et al., *J. Immunol.* 24 (1994) 249).

El término «receptor Fc gamma», abreviado a «FcγR» o «FcγgammaR», denota cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc de un anticuerpo IgG y está codificado por un gen *FcγR*. En seres humanos esta familia incluye pero no está limitada a FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIA, FcγRIB y FcγRIC, FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIA (incluidos los allotypes H131 y R131), FcγRIIB (incluyendo FcγRIIB-1 y FcγRIIB-2), y FcγRIIC, y FcγRIII (CD16), incluyendo isoformas de FcγRIIIA (incluidos los allotypes V158 y F158; Swiss-Prot entrada P08637; N-terminal-

MRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQ-C-terminal; SEQ ID NO: 18) y FcγRIIIb (incluidos los alotipos FcγRIIB-NA1 y FcγRIIB-NA2) (véase, por ejemplo, Jeffcris et al., Immunol. Lett. 82 (2002) 57-65), así como las isoformas o alotipos de FcγR. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen pero no se limitan a FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como isoformas o alotipos de FcγR. Los residuos de aminoácidos implicados en la interacción región Fc--FcγR son 234-239 (región bisagra inferior), 265-269 (bucle B/C), 297-299 (bucle D/E) y 327-332 (F/G) (Sondermann, et al., Nature 406 (2000) 267-273). Las mutaciones de aminoácidos que dan lugar a una disminución de la unión/afinidad por los FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y/o FcγRIIIA incluyen N297A (concomitantemente con una disminución de la inmunogenicidad y semivida de unión/afinidad prolongada) (Routledge et al., Transplantation 60 (1995) 847; Friend et al., Transplantation 68 (1999) 1632; Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (1995) 6591), residuos 233-236 (Ward y Ghetie, Ther. Immunol. 2 (1995) 77; Armor et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 249). Algunas sustituciones de aminoácidos ejemplares se describen en los documentos US 7.355.008 y US 7.381.408.

El término «receptor neonatal Fc», abreviado a «FcRn», denota una proteína que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG y está codificada al menos en parte por un gen *FcRn*. El FcRn puede provenir de cualquier organismo, incluyendo pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, a los que se hace referencia a menudo como cadena pesada y cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada está codificada por el gen *FcRn*. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina. Los residuos de aminoácidos de interacción de la región Fc con el FcRn están cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los residuos de contacto de región Fc-FcRn están todos dentro de una única cadena pesada de la IgG. Los residuos de aminoácidos afectados son 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 (todos en el dominio CH2) y los residuos de aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 (todos en el dominio CH3). Las mutaciones de aminoácido que dan como resultado una mayor unión/afinidad por el FcRn incluyen T256A, T307A, E380A y N434A (Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 249).

Los residuos de aminoácidos del FcRn que se conservan a través de las especies son los residuos de histidina en las posiciones 310 y 435 en la región Fc. Estos residuos son responsables de la dependencia del pH de la interacción FcRn-región Fc (véase, por ejemplo, Victor, G., et al., Nature Biotechnol. 15 (1997) 637-640); Dall'Acqua, W. F., et al. J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180). Las mutaciones en la región Fc que atenúan la interacción con FcRn pueden reducir la semivida del anticuerpo.

El término «región bisagra» denota la parte de un polipéptido de cadena pesada de un anticuerpo que se une al dominio CH1 y al dominio CH2, por ejemplo desde aproximadamente la posición 216 hasta aproximadamente la posición 230 según el sistema de numeración EU de Kabat. La región bisagra es normalmente una molécula dimérica que consiste en dos polipéptidos con secuencia de aminoácidos idéntica. La región bisagra comprende, en general, aproximadamente 25 residuos de aminoácidos y es flexible permitiendo que las regiones de unión al antígeno se muevan independientemente. La región bisagra puede subdividirse en tres dominios: el dominio de bisagra superior, medio e inferior (Roux et al., J. Immunol. 161 (1998) 249).

La región bisagra es normalmente una molécula dimérica que consiste en dos polipéptidos con secuencia de aminoácidos idéntica. La región bisagra comprende, en general, aproximadamente 25 residuos de aminoácidos y es flexible permitiendo que las regiones de unión al antígeno se muevan independientemente. La región bisagra puede subdividirse en tres dominios: el dominio de bisagra superior, medio e inferior (véase, por ejemplo, Roux et al., J. Immunol. 161 (1998) 249).

El término «región bisagra inferior» de una región Fc denota el tramo de residuos aminoácidos inmediatamente C-terminal a la región bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc de acuerdo con la numeración EU de Kabat.

El término «región Fc natural» denota una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas naturales incluyen una región Fc de IgG1 humana nativa (alotipos no A y A), región Fc de IgG2 humana nativa, región Fc de IgG3 humana nativa y región Fc de IgG4 humana nativa, así como variantes de origen natural de las mismas.

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

Un «vehículo farmacéuticamente aceptable» se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, un excipiente, un estabilizante o un conservante.

El término «polipéptido» denota un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean

- 5 producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos pueden denominarse «péptidos», mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácidos pueden denominarse «proteínas». Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos de carbohidratos, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden ser añadidos por la célula, en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de la estructura de su esqueleto de aminoácidos o el ácido nucleico que codifica la misma. Las adiciones tales como grupos de carbohidratos en general no se especifican; no obstante pueden estar presentes.
- 10 El término «marcador de secuencia de aminoácidos» denota una secuencia de residuos de aminoácidos conectados entre sí a través de enlaces peptídicos que tiene propiedades de unión específicas. En un modo de realización, el marcador de secuencia de aminoácidos es un marcador de afinidad o de purificación. En un modo de realización, el marcador de secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que comprende Arg-tag, His-tag, Avi-tag, His-Avi-tag, Flag-tag, 3xFlag-tag, Strep-tag, Nano-tag, SBP-tag, c-myc-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, GST-tag y MBP-tag. En un modo de realización el marcador de secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que comprende la SEQ ID NO: 19 (RRRRR), SEQ ID NO: 20 (RRRRR), SEQ ID NO: 21 (Avi-tag), SEQ ID NO: 22 (His-Avi-tag), SEQ ID NO: 23 (HHHHH), SEQ ID NO: 24 (KDHLIHNVHKEFHAAHANK), SEQ ID NO: 25 (DYKDDDDK), SEQ ID NO: 26 (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK), SEQ ID NO: 27 (AWRHPQFGG), SEQ ID NO: 28 (WSHPQFEK), SEQ ID NO: 29 (MDVEAWLGAR), SEQ ID NO: 30 (MDVEAWLGARVPLVET), SEQ ID NO: 31 (MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP), SEQ ID NO: 32 (EQKLISEEDL), SEQ ID NO: 33 (KETAAAKFCRQHMD), SEQ ID NO: 34 (KRRWKKNFIAVSAANRFKISSGAL), SEQ ID NO: 35 (dominio de unión a la celulosa), SEQ ID NO: 36 (dominio de unión a la celulosa), SEQ ID NO: 37 (TNPVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSPALWQLQ), SEQ ID NO: 38 (GST-tag) y SEQ ID NO: 39 (MBP-tag).
- 25 El término «sitio de escisión enzimática» denota una secuencia de residuos de aminoácidos conectados entre sí a través de enlaces de péptidos que pueden escindirse específicamente por una proteasa. En un modo de realización, la proteasa es proteasa de IgA, grancima B, proteasa Tev, proteasa PreScission, trombina, factor 10a, proteasa Ides o enterocinasa.
- 30 El término «proteasa de IgA» denota una proteasa derivada de *Neisseria gonorrhoeae* con un sitio de reconocimiento que comprende una de las siguientes secuencias en las que «↓» denota la posición del enlace escindido:
- | | | |
|----|-------------------------------|------------------|
| 35 | Pro-Ala-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 40), |
| | Pro-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Pro-Pro ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Pro-Pro ↓ Gly-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| 40 | Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Val-Val-Ala-Pro-Pro ↓ Gly-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| 45 | Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Thr-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Ala-Pro-Pro-Ala ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Ala-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Ser-Pro | (SEQ ID NO: 41), |
| | Pro-Arg-Pro-Pro ↓ Gly-Pro | (SEQ ID NO: 54). |
- 50 El término «conector» o «conector peptídico» tal como se usa en la presente solicitud denota los conectores peptídicos de origen natural y/o sintético. Consisten en una cadena de aminoácidos lineal en la que los 20 aminoácidos naturales son las unidades estructurales monoméricas. La cadena tiene una longitud de 1 a 50 aminoácidos, se preferentemente entre 1 y 28 aminoácidos, especialmente preferente entre 3 y 25 aminoácidos. El conector puede contener secuencias de aminoácidos repetitivas o secuencias de polipéptidos de origen natural, tales como polipéptidos con una función de bisagra. El conector tiene la función de garantizar que un péptido conjugado con un anticuerpo anti-CD4 pueda realizar su actividad biológica permitiendo que el péptido se pliegue correctamente y se presente correctamente. Preferentemente, el conector es un «conector peptídico sintético» que se designa como rico en residuos de glicina, glutamina y/o serina. Estos residuos están dispuestos, por ejemplo, en pequeñas unidades repetitivas de hasta cinco aminoácidos, tales como GGGGS, QQQQG o SSSSG. Esta pequeña unidad repetitiva puede repetirse de dos a cinco veces para formar una unidad multimérica. En los extremos amino- y/o carboxiterminales de la unidad multimérica pueden añadirse hasta seis aminoácidos adicionales arbitrarios, de origen natural. Otros conectores peptídicos sintéticos están compuestos de un solo aminoácido que se repite entre 10 a 20 veces y puede comprender en el extremo amino- y/o carboxiterminal hasta seis aminoácidos adicionales arbitrarios de origen natural. Todos los conectores peptídicos pueden estar codificados por una molécula de ácido nucleico y, por lo tanto, se pueden expresar de forma recombinante.
- 65

Polipéptido de fusión como se informa en el presente documento

5 Frecuentemente la expresión de polipéptidos como polipéptido de fusión con la región Fc da como resultado la formación de agregados multiméricos de composición no definida. También la expresión del polipéptido de fusión con la región Fc es difícil debido al impedimento estérico entre las dos cadenas.

10 Se ha encontrado que los polipéptidos, que son biológicamente activos como n-mérico y forman agregados/multímeros no definidos tras la expresión, se pueden obtener en forma soluble expresando estos polipéptidos como polipéptido de fusión con una región Fc que no se une sustancialmente a un receptor Fc. El uso de un polipéptido de fusión para la expresión del polipéptido aumenta el rendimiento obtenible del polipéptido ya sea en forma del polipéptido de fusión o como polipéptido aislado. Se ha encontrado además que el polipéptido permanece en una forma n-mérica definida después de la escisión y la eliminación de la región Fc. Especialmente adecuadas son las regiones Fc que no se unen sustancialmente a un receptor Fc.

15 El término «no se une sustancialmente a un receptor Fc» denota que la región Fc comprendida en el polipéptido de fusión no se une a un receptor Fc hasta tal punto que se formen agregados.

20 El polipéptido se puede fusionar con la región Fc ya sea directamente, o a través de un conector peptídico, o a través de un sitio de escisión de la proteasa, o a través de un conector peptídico combinado con un sitio de escisión de la proteasa.

25 Se ha encontrado que puede obtenerse un polipéptido de fusión dimérico asimétrico que comprende un sitio de escisión enzimática en un polipéptido de fusión mientras que el segundo polipéptido de fusión no comprende un sitio de escisión enzimático. Por lo tanto, en un ejemplo el polipéptido de fusión dimérico comprende dos polipéptidos de fusión idénticos excepto que solo un polipéptido de fusión comprende un sitio de escisión enzimática entre el polipéptido biológicamente activo y la región Fc.

30 Mediante la expresión del polipéptido biológicamente activo como polipéptido de fusión como se informa en el presente documento, el rendimiento de expresión obtenible puede aumentarse o puede lograrse en su totalidad la producción a gran escala del polipéptido biológicamente activo.

Asimismo, es posible usar un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento para mejorar las propiedades farmacocinéticas del polipéptido biológicamente activo.

35 Asimismo, es posible mediante el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento proporcionar citocinas y receptores de citocinas solubles.

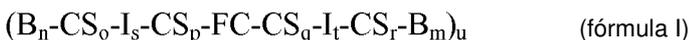
40 Es posible proporcionar receptores de citocinas en forma biológicamente activa usando un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento. Estos receptores de citocinas no son biológicamente activos en forma escindida.

Mediante el uso del polipéptido de fusión como se informa en el presente documento es posible proporcionar dominios y/o receptores de membrana funcionales, biológicamente activos y solubles.

45 Mediante el uso de un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento es posible forzar la dimerización de citocinas basada en disulfuro antes de la escisión del polipéptido de fusión y liberación de la citocina dimérica.

50 Asimismo, es posible mediante el uso del polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento proporcionar citocinas heterodiméricas enlazadas por disulfuros mediante enlace forzado de disulfuros.

En el presente documento se informa de un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I



55 en la que B denota un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC denota un polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

60 CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

65 en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y

$r = 0$,

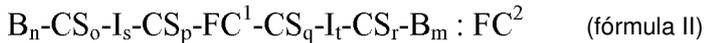
en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

5

en la que $u = 1$ o 2 ,

en la que FC no se une sustancialmente a un receptor Fc.

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



15

en la que B denota un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC^1 denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

20

FC^2 indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

25

en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

30

en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

en la que el primer FC y el segundo FC están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro,

35

en la que FC^1 y FC^2 no se unen sustancialmente a un receptor Fc.

El polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada puede ser de cualquier especie incluyendo, pero sin limitarse a, ser humano, ratón, rata, conejo y mono.

40

En un modo de realización el polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada (= B en la fórmula I o fórmula II) se selecciona del grupo de IL17, IL18, IL33, IL18R, IL33R, TNF, TWEAK y TL1a.

45

En un modo de realización, FC es una variante de un polipéptido de cadena pesada seleccionado del grupo de polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG2 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG3 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG1 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG2a murina, polipéptido de cadena pesada de IgG3 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG de conejo.

50

La región Fc comprendida en el polipéptido de fusión como se informa en el presente documento no se unirá sustancialmente a un receptor Fc.

55

En un modo de realización el polipéptido de fusión no posee sustancialmente funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que ciertas funciones efectoras son innecesarias o nocivas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/supresión de las funciones efectoras. Por ejemplo se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el polipéptido de fusión carezca de unión a Fc γ R (por tanto es probable que carezca de actividad de ADCC). Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan Fc γ RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente de EE. UU. N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); patente de EE. UU. N.º 5.821.337 (véase Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). De forma alternativa se pueden emplear procedimientos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View,

65

CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (células NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. La unión a FcRn y las determinaciones de aclaramiento/semivida *in vivo* se pueden realizar también usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Las afinidades y propiedades de unión de una región Fc por su ligando pueden determinarse mediante una variedad de procedimientos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica para determinar las interacciones región Fc/FcR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcγR, incluyendo, pero no se limitan a, procedimientos de equilibrio (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinéticos (por ejemplo, análisis BIACORE®), y otros procedimientos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros procedimientos pueden usar un marcador en uno o más de los componentes que se están examinando y/o emplear una variedad de procedimientos de detección que incluyen, pero no se limitan a, marcadores cromógenos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos. Una descripción detallada de afinidades de unión y la cinética se puede encontrar en Paul, WE, ed., Fundamental Immunology, 4.^a Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999).

En un modo de realización, FC¹ y FC², independientemente uno de otro, son o bien una región Fc de origen humano de la subclase IgG4 o una región Fc de origen humano de la subclase IgG1, IgG2 o IgG3, que se modifica de tal manera que no haya unión a ningún receptor de Fcγ (por ejemplo, FcγRIIIa). En un modo de realización, FC¹ y FC², independientemente uno de otro, son una región Fc de origen humano, especialmente de la subclase IgG4 humana o una región Fc mutada de la subclase IgG1 humana. En un modo de realización, FC¹ y FC², independientemente uno de otro, son de la subclase IgG1 humana con mutaciones L234A y L235A. En un modo de realización, FC¹ y FC², independientemente uno de otro son de la subclase IgG4 humana con mutación S228P. Mientras que la IgG4 muestre una unión al receptor de Fcγ reducida (FcγRIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y/o His435 son residuos que, si se alteran, proporcionan también una unión al receptor de Fcγ reducida (Shields, RL, et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434). En un modo de realización, FC¹ y FC², independientemente uno de otro, se refieren a la unión al receptor de Fcγ de la subclase IgG4, o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265 y/o contiene la mutación PVA236. En un modo de realización, FC¹ y FC², independientemente uno de otro, comprenden una o más de las mutaciones S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en un código de aminoácidos de una letra) desde la posición de aminoácidos 233 a 236 de la IgG1 o EFLG de la IgG4 se reemplaza por PVA). En un modo de realización, las mutaciones son S228P para IgG4, y L234A y L235A para IgG1.

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

Las regiones con función efectora reducida incluyen aquellas con sustitución de uno o más de los residuos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (patente de EE.UU. N.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc «DA» con la sustitución del residuo 265 y el denominado mutante Fc «DANA» con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente de EE. UU. N.º 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de la región Fc con unión mejorada o disminuida al FcR (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

En algunos modos de realización, se hacen alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) modificadas, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 e Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; los documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y WO 94/29351 en relación a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

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

- En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 233, 234, 235, 236, 265, 297, 329 y 331.
- 5 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene una o más de las mutaciones de aminoácidos E233P, L234A, L235A, L235E, AG236, D265A, N297A, N297D, P329A, P329G y P331S.
- En un modo de realización, el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene las mutaciones de aminoácidos L234A y L235A y uno o más de E233P, L235E, AG236, D265A, N297A, N297D, P329A, P329G y P331S.
- 10 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana tiene las mutaciones de aminoácidos L234A y L235A y P329A o P329G.
- En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG2 humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 233, 234, 235, 236, 265 y 329.
- 15 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 228, 235, 265 y 329.
- En un modo de realización, el polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana tiene una o más de las mutaciones S228P, L235E, P329A y P329G.
- 20 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana tiene las mutaciones S228P y L235E y P329A o P329G.
- 25 En un modo de realización el polipéptido de la región Fc de la cadena pesada tiene una mutación de aminoácido en una o más de las posiciones 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 272, 285, 288, 290, 291, 308, 309, 310, 311, 314, 385, 386, 387, 428, 433, 434, 435 y 436. En un modo de realización uno o más de los receptores Fc es un FcRn.
- 30 En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana tiene una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y/o 447.
- En un modo de realización el polipéptido de cadena pesada de IgG humana que tiene una unión reducida a FcRn tiene una o más alteraciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 y/o 447.
- 35 El polipéptido de fusión puede comprender entre el polipéptido biológicamente activo y la región Fc un polipéptido conector. Este polipéptido conector puede usarse para ajustar la distancia entre el polipéptido biológicamente activo y la región Fc para permitir que ambas regiones funcionen de la manera prevista.
- 40 En un modo de realización, el polipéptido conector se selecciona del grupo que comprende (G₃S)₃, (G₃S)₄, (G₃S)₅, (G₃S)₆, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₄S)₆, (G₅S)₂, (G₅S)₃, (G₅S)₄, y cualquier combinación de los mismos.
- 45 Adicionalmente, el polipéptido de fusión puede comprender entre el polipéptido biológicamente activo y la región Fc un marcador, por ejemplo adecuado para purificación por afinidad o inmovilización.
- En un modo de realización, el marcador se selecciona de un grupo que comprende Arg-tag, Avi-tag, His-Avi-tag, His-tag, Flag-tag, 3xFlag-tag, Strep-tag, Nano-tag, SBP-tag, c-myc-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, GST-tag, MBP-tag, estreptavidina o avidina, biotina, lectina, polisacárido, esteroide, proteína de unión a esteroides, hormona y receptor hormonal.
- 50 El polipéptido conector y el marcador pueden combinarse en una secuencia de aminoácidos que intercalada que está situada entre el polipéptido biológicamente activo y la región Fc.
- 55 En un modo de realización, la secuencia de aminoácidos intercalada se selecciona de un primer grupo que comprende (G₃S)₃, (G₃S)₄, (G₃S)₅, (G₃S)₆, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅, (G₄S)₆, (G₅S)₂, (G₅S)₃, (G₅S)₄, y cualquier combinación de los mismos, o de un segundo grupo que comprende Arg-tag, Avi-tag, His-Avi-tag, His-tag, Flag-tag, 3xFlag-tag, Strep-tag, Nano-tag, SBP-tag, c-myc-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, GST-tag, o MBP-tag, o de combinaciones de dos elementos de estos grupos.
- 60 La secuencia de aminoácidos intercalada puede estar situada antes o después de un sitio de escisión en el polipéptido de fusión.
- 65 En un modo de realización, el sitio de escisión es un sitio de escisión enzimática. En un modo de realización, el sitio de escisión enzimática se selecciona del grupo que comprende el sitio de escisión de la proteasa proteasa de IgA, el sitio

de escisión de la proteasa granzima B, el sitio de escisión de la proteasa Tev, el sitio de escisión de la proteasa PreScission, el sitio de escisión de la trombina, el sitio de escisión del factor 10a, el sitio de escisión de la proteasa ldes, sitio de escisión de proteasa SUMO (Ulp1 (proteasa específica de Ub1) de *Saccharomyces cerevisiae*) y el sitio de escisión la de enterocinasa. En un modo de realización, el sitio de escisión se selecciona del grupo de sitio de escisión de la proteasa de IgA, el sitio de escisión de la proteasa PreScission, el sitio de escisión de grancima B y el sitio de escisión de la proteasa ldes.

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

En el presente documento se informa de un polipéptido de fusión dimérica que comprende dos polipéptidos de fusión como se informa en el presente documento.

Un aspecto como se describe en el presente documento es un polipéptido dimérico que comprende un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento y una región Fc.

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

Dado que el polipéptido de fusión como se informa en el presente documento comprende una región Fc que a su vez comprende una región de bisagra de inmunoglobulina, el polipéptido dimérico comprende uno o más puentes disulfuro que unen covalentemente el polipéptido de fusión con la región Fc.

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

En el presente documento se informa de un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula I

$$(B_n-CS_o-I_s-CS_p-FC-CS_q-I_r-CS_r-B_m)_u \quad (\text{fórmula I})$$

en la que B denota un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC denota un polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

en la que $u = 2$,

en la que FC no se une sustancialmente a un receptor Fc.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un polipéptido dimérico que comprende un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II

$$B_n-CS_o-I_s-CS_p-FC^1-CS_q-I_r-CS_r-B_m : FC^2 \quad (\text{fórmula II})$$

en la que

B designa un polipéptido que es biológicamente activo como 1-mérico, 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC^1 denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

FC^2 indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

5 en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

10 en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

en la que FC^1 y FC^2 están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro (:),

15 en la que FC^1 y FC^2 no se unen sustancialmente a un receptor Fc.

Dado que el polipéptido dimérico puede formarse por la combinación de dos polipéptidos diferentes, o un polipéptido y un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento, o dos polipéptidos de fusión diferentes como se informa en el presente documento, se tiene que usar un mecanismo para garantizar la heterodimerización.

20 En un modo de realización, el primer FC comprende la mutación T366W y opcionalmente la mutación S354C y el segundo FC comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V y opcionalmente la mutación Y349C.

En un ejemplo, el polipéptido de fusión se caracteriza porque

25 a) B del primer y segundo polipéptidos de fusión son idénticos, o

b) B del primer polipéptido de fusión y B del segundo polipéptido de fusión son diferentes.

30 En un modo de realización se ha suprimido el residuo de lisina C-terminal en la(s) región(ones) FC. Esto da como resultado la supresión de un presunto sitio de escisión enzimática.

Aplicaciones del polipéptido de fusión como se informa en el presente documento

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

40 En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico está unido a una fase sólida. En un modo de realización, la fase sólida es un material de cromatografía. En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico está biotinilado y la fase sólida se derivatiza con estreptavidina.

45 En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérica comprende un sitio de escisión entre el receptor Fc y la región Fc. En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico se escinde antes de la biotinilación.

50 En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérica comprende un marcador de inmovilización entre el polipéptido biológicamente activo y el sitio de escisión. En un modo de realización, el marcador de inmovilización es un marcador His-Avi o un marcador Avi.

También se informa de una columna de cromatografía de afinidad que comprende una matriz y grupos funcionales cromatográficos unidos a matrices, caracterizada porque el grupo funcional cromatográfico unido a matrices comprende un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento.

55 En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérica comprende un sitio de escisión entre el polipéptido biológicamente activo y la región Fc. En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico se escinde antes de la biotinilación.

60 En un modo de realización, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérica comprende un marcador de inmovilización entre el polipéptido biológicamente activo y el sitio de escisión. En un modo de realización, el marcador de inmovilización es un marcador His-Avi o un marcador Avi.

65 Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento para la producción de un polipéptido biológicamente activo 2-mérico (dimérico) o 3-mérico (trimérico), por el que el polipéptido 2-mérico (dimérico) o 3-mérico (trimérico) biológicamente activo se obtiene después de la escisión enzimática del polipéptido de fusión, y por el que el polipéptido biológicamente activo 2-mérico (dimérico)

o 3-mérico (trimérico) permanece en la forma 2-mérica (dimérico) o 3-mérica (trimérica) después de la escisión.

En el presente documento se describe el uso de un polipéptido de fusión dimérico de fórmula III

5 $B_n\text{-CS}_o\text{-I}_s\text{-CS}_p\text{-FC}^1\text{-CS}_q\text{-I}_t\text{-CS}_r\text{-B}_m : B_n\text{-I}_s\text{-FC}^2\text{-I}_t\text{-B}_m$
(fórmula III)

en la que

10 B designa un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC¹ denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

15 FC² indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

20 en la que $n = 1$ y $m = 0$, o $n = 0$ y $m = 1$,

en la que si $n = 1$ entonces $o = 0$ o 1 , y si $o = 0$ entonces $p = 0$ o 1 , y si $o = 1$ entonces $p = 0$ y $s = 0$ o 1 y $q = 0$ y $t = 0$ y $r = 0$,

25 en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

en la que FC¹ y FC² están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro (:),

30 en la que FC¹ y FC² no se unen sustancialmente a un receptor Fc, para la producción de citocinas diméricas voluminosas (impedidas estéricamente).

35 Se ha encontrado que puede obtenerse un polipéptido de fusión dimérico asimétrico que comprende un sitio de escisión enzimática en un polipéptido de fusión mientras que el segundo polipéptido de fusión no comprende un sitio de escisión enzimática. Por lo tanto, en un ejemplo el polipéptido de fusión dimérico comprende dos polipéptidos de fusión idénticos excepto que solo un polipéptido de fusión comprende un sitio de escisión enzimática entre el polipéptido biológicamente activo y la región Fc.

40 Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento para aumentar la semivida *in vivo* de un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en la ausencia de una región Fc fusionada.

45 Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento para proporcionar una citocina o receptor de citocinas soluble.

Es posible proporcionar receptores de citocinas en forma biológicamente activa usando un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento. Estos receptores de citocinas no son biológicamente activos en forma escindida.

50 Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento para proporcionar receptores de membrana y/o dominios de receptores de membrana funcionales, biológicamente activos y solubles.

55 Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento para proporcionar citocinas diméricas enlazadas por disulfuro, por el que el enlace disulfuro se forma antes de la escisión enzimática del polipéptido de fusión.

60 Mediante el uso de un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento es posible forzar la dimerización de citocinas basada en disulfuro antes de la escisión del polipéptido de fusión y liberación de la citocina dimérica.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el uso de un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento para producir una citocina heterodimérica enlazada a disulfuro.

65 Asimismo, es posible mediante el uso del polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento proporcionar citocinas heterodiméricas enlazadas por disulfuros mediante enlace forzado de disulfuros.

Procedimientos recombinantes

En el presente documento se describe un procedimiento para la producción de un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada que comprende las siguientes etapas

a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento,

b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,

c) opcionalmente escindir el polipéptido de fusión con una proteasa y, de este modo, producir un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada.

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

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o el polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento se puede expresar en una célula huésped. Después de la expresión recombinante, el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico puede purificarse por procedimientos conocidos por un experto en la técnica. Estos procedimientos están bien establecidos y se utilizan ampliamente para la purificación de inmunoglobulinas y se emplean solos o en combinación. Dichos procedimientos son, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando proteínas derivadas de microbios (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y cromatografía de intercambio mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), interacción hidrófoba o cromatografía de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefara, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño, y procedimientos electroforéticos preparativos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102).

Los casetes de expresión comprenden un promotor, un segmento de ADN que codifica una secuencia señal de secreción, el gen estructural y una señal de terminación/poliadenilación. Los elementos se ensamblan en una forma operativamente enlazada bien en un plásmido que codifica todos los polipéptidos de fusión diferentes requeridos, o en dos o más plásmidos cada uno de los cuales codifica un polipéptido de fusión. Para la expresión de los genes estructurales, el(los) plásmido(s) se introduce(n) en una célula huésped adecuada. Las proteínas se producen en células de mamífero tales como células CHO, células NSO, células Sp2/0, células COS, células HEK, células K562, células BHK, células PER.C6® y similares. En un modo de realización, el polipéptido de fusión se expresa en una célula CHO, o una célula BHK o una célula HEK. Los elementos reguladores del plásmido han de seleccionarse de manera que sean funcionales en la célula huésped seleccionada. Los polipéptidos de fusión expresados están ensamblados funcionalmente.

Un «plásmido de expresión» es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del gen o genes estructurales comprendidos en una célula huésped. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmidos procariotas, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación, y un marcador seleccionable, un marcador de selección eucariótico y una o más casetes de expresión para la expresión del gen o genes estructurales de interés, cada uno de los cuales comprende un promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca usualmente bajo el control de un promotor y dicho gen estructural se dice que está «operativamente enlazado al» promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor mínimo están enlazados operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor mínimo.

Los anticuerpos se pueden producir por procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de fusión descrito en el presente documento o un polipéptido de fusión dimérico descrito en el presente documento. En un modo de realización se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped contiene (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un primer polipéptido de fusión y una secuencia de aminoácidos que comprende un segundo polipéptido de fusión, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende un primer polipéptido de fusión y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una

5 secuencia de aminoácidos que comprende un segundo polipéptido de fusión. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, célula YO, NSO, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de obtención de un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión dimérico, en el que dicho procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico, y opcionalmente, recuperar el polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico de la célula huésped (o del medio de cultivo de las células huésped).

10 Para la producción recombinante de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento, se aísla un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión dimérico, por ejemplo, como se describe anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican el polipéptido de fusión).

15 Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el polipéptido incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523 (véase también Charlton, KA, en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, BKC (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), páginas 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

20 Además de los procariotas, los microbios eucariotas, por ejemplo, los hongos filamentosos y las levaduras, son huéspedes adecuados para clonación o expresión para vectores que codifican un polipéptido de fusión, incluyendo cepas de hongos y levaduras, cuyas rutas de glicosilación se han «humanizado», lo que da como resultado la producción de un polipéptido de fusión con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano (véase Gemgross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215).

25 Las células huésped adecuadas para la expresión de un polipéptido de fusión glicosilado también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar en combinación con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

30 Se pueden usar también cultivos celulares de plantas como huéspedes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

35 Las células de vertebrados también se pueden usar como huéspedes. Pueden ser útiles, por ejemplo, líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos que pueden ser útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o las células 293 descritas, por ejemplo, en Graham, F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36:59, (1977)); las células de riñón de cría de hámster (BHK); las células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); las células de riñón de mono (CV1); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76); las células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); las células de riñón canino (MDCK); las células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); las células de pulmón humano (W138); las células de hígado humano (Hep G2); las células de tumor de mama de ratón (MMT 060562); las células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383, 44-68, 1982; LAS células MRC 5; y LAS células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR (Urlaub, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como YO, NSO y Sp2/0. Para una revisión de algunas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yyazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), páginas 255-268.

Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y detección

60 En ciertos modos de realización, cualquiera de los polipéptidos de fusión o polipéptidos de fusión diméricos proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de citocinas o receptores de citocina en una muestra biológica. El término «detectar» como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa.

65 En un modo de realización, se proporciona un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una citocina o

un receptor de citocinas en una muestra biológica. En ciertos modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico a una citocina o un receptor de citocinas, y detectar si se forma un complejo entre el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico y una citocina o un receptor de citocinas. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*.

En ciertos modos de realización, se proporcionan polipéptidos de fusión marcados o polipéptidos de fusión diméricos marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, P-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de un polipéptido de fusión como se informa en el presente documento o un polipéptido de fusión dimérico como se informa en el presente documento se preparan mezclando dicho polipéptido de fusión con el grado de pureza deseado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.ª edición, Osol, A. (Ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, son atóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo en el presente documento incluyen, además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutra-activa soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP de ejemplo y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas de ejemplo se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en el documento US 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación del presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Dichos principios activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los principios activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido de fusión, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se usan para la administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilidad se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Procedimientos y composiciones terapéuticas

- 5 Cualquiera de los polipéptidos de fusión como se informa en el presente documento o los polipéptidos de fusión diméricos como se informa en el presente documento se pueden usar en procedimientos terapéuticos.
- 10 En un aspecto, se proporciona un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión dimérico para su uso como medicamento. En ciertos modos de realización, se proporciona un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión dimérico para su uso en un procedimiento de tratamiento. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende además la administración al individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un «sujeto» de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano.
- 15 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión dimérico en la producción o preparación de un medicamento. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende además la administración al individuo de una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un «sujeto» de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.
- 20 En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los polipéptidos de fusión como se informa en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los polipéptidos de fusión como se informa en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los polipéptidos de fusión como se informa en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional.
- 25 Los polipéptidos de fusión de la invención se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un polipéptido de fusión de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional.
- 30 Dichos tratamiento combinados indicados anteriormente abarcan la administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del polipéptido de fusión de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional.
- 35 Un polipéptido de fusión de la invención o un polipéptido de fusión dimérico (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación se puede realizar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan varios programas de dosificación incluyendo, pero no limitados a, administraciones individuales o múltiples en varios puntos temporales, administración en bolo e infusión pulsada.
- 40
- 45 Los polipéptidos de fusión de la invención o polipéptidos de fusión diméricos de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una manera coherente con buena práctica médica. Los factores que se deben considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que vaya a tratarse, el mamífero particular que se tratará, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de liberación del agente, el procedimiento de administración, el calendario de administración y otros factores conocidos por los médicos. El polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico no necesita formularse, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de polipéptido de fusión o de polipéptido de fusión dimérico presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosis y por las vías de administración que se describen en el presente documento, o de aproximadamente un 1 a un 99 % de las dosis descritas en el presente documento, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente como apropiada.
- 50
- 55 Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un polipéptido de fusión de la invención o del polipéptido de fusión dimérico de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que vaya a tratarse, del tipo de polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, de si el polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico se administra con fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de los antecedentes clínicos del paciente y de su respuesta al polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico y del criterio del médico responsable. El polipéptido de fusión o el polipéptido de fusión dimérico se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,5 mg/kg a 10 mg/kg) de polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico puede ser una dosis inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica
- 60
- 65

podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría, en general, hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico o estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del polipéptido de fusión o polipéptido de fusión dimérico). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otras pautas posológicas pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se vigila fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión dimérico.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o en combinación con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un polipéptido de fusión de la invención o un polipéptido de fusión dimérico de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Por otra parte, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un polipéptido de fusión de la invención o un polipéptido de fusión dimérico de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico adicional o, por lo demás, terapéutico. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución glucosada. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

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

Los siguientes ejemplos, figuras y secuencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de los plásmidos de expresión para la expresión del polipéptido de fusión que contiene el receptor Fc

A) Generación del plásmido de expresión para un polipéptido de fusión Fcγ₁V158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G

El gen codificante del polipéptido de fusión Fcγ₁V158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G se ensambló fusionando fragmentos de ADN sintetizados químicamente codificando i) una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina (MGWSCIIILFLVATATGVHS: SEQ ID NO: 55); ii) un receptor de Fc gamma humano IIIa V158 a partir de los residuos de aminoácidos 2-193 (es decir, excluyendo la metionina de partida), e iii) una región constante de cadena pesada de Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH₂-CH₃) con las mutaciones L234A, L235A y P329G.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria de un polipéptido de fusión Fcγ₁V158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G en células HEK293 comprendía, además del casete de expresión del polipéptido de fusión Fcγ₁V158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G, un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen que codifica el polipéptido de fusión Fcγ₁V158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G comprende los siguientes elementos funcionales:

ES 2 633 894 T3

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un polipéptido VI58 del receptor III de Fc gamma humano soluble de la posición 2-193 del aminoácido de la proteína VI58 del receptor III de Fc humano natural,
- una región constante de cadena pesada de Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3, LALA P329G), y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión FcgammaRIIIaV158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G maduro es:

```

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

(SEQ ID NO: 56).

Los siguientes polipéptidos de fusión se pueden obtener de manera análoga:

- polipéptido de fusión FcgammaRIIa-LR (H131) -Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G:

```

QAAAPPKAVL KLEPPWINVL QEDSVTLTCQ GARSPESDSI QWFHNGNLIPTHT
THTQPSYRFK ANNNDSGEYT CQTGQTSLSLSD PVHLTVLSEW LVLQTPHLEFQEG
QEGETIMLRC HSWKDKPLVK VTFQNGKSKFS KFSHLDPFIS IPQANSHSGDYH
DYHCTGNIGY TLFSSKPVTI TVQVPSMGSS SPMGIGLNDI FEAQKIEWHE
LUVAPPAPED KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPPKPDTL MISRTPEVTC
VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKC KVS NKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESN GQPENNY KTT PPVLDSD GSFFLYSKLT
VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
    
```

(SEQ ID NO: 57).

- polipéptido de fusión FcgammaRIIb-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G :

```

APPKAVLKLE PQWINVLQED SVTLTCRGTH SPESDSIQWF HNGNLIPTHT
QPSYRFKANN NDSGEYTCQT GQTSLSLSDPVH LTVLSEWLVL QTPHLEFQEG
ETIVLRCHSW KDKPLVKVTF FQNGKSKKFS RSDPNFSIPQ ANSHSGDYH
CTGNIGYTLY SSKPVTITVQ APGLNDIFEA QKIEWHELTV APPAPEDKTH
TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFPY
SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK
    
```

(SEQ ID NO: 58).

- polipéptido de fusión FcgammaRIIIb-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G:

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

(SEQ ID NO: 59).

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

GWLLLQAPRW VFKEEDPIHL RCHSWKNTAL HKVTYLQNGK GRKYFHHNSD
 FYIPKATLKD SGSYFCRGLV GSKNVSSETV NITITQGLAV STISSFFPPG
 YQGLNDIFEA QKIEWHELED KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL
 MISRTPEVTC VVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYP SDIAVEW ESNGQPENNY KTT PPVLDSD
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

(SEQ ID NO: 60).

10

C) Generación de los plásmidos de expresión «botón en ojal» para el polipéptido de fusión con receptor Fc dimérico

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

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

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

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

35

Ejemplo 2

Expresión transitoria, purificación y caracterización analítica del polipéptido de fusión FcgammaRIIIaV158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G

40

Los polipéptidos de fusión se obtuvieron por transfección transitoria de células HEK293 (derivadas de línea celular de riñón embrionario humano 293) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección «293-Free» (Novagen). Los pares de polipéptidos de fusión de botón en ojal se expresaron a partir de dos plásmidos diferentes usando una relación de plásmido equimolar tras la transfección. Las transfecciones se realizaron como se especificaba en las instrucciones del fabricante. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular que contenían polipéptido de fusión siete días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura

45

reducida hasta su purificación.

La información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, en células HEK293 se da en: Meissner, P., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

5 Los sobrenadantes del cultivo que contienen polipéptido de fusión se filtraron y purificaron mediante dos etapas cromatográficas. Los polipéptidos de fusión se capturaron mediante cromatografía de afinidad utilizando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrada con PBS (KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), pH 7,4. Las proteínas no unidas se extrajeron mediante lavado con tampón de equilibrado, y el polipéptido de fusión se recuperó con tampón citrato 0,05 M, pH 3, inmediatamente después de la elución se neutralizó a pH 6,5 con Tris-base 1 M, pH 9,0. Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como segunda etapa de purificación. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó en tampón MOPS 2 mM, NaCl 0,125 M, pH 7,2. Los polipéptidos de fusión eluidos se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

15 Se purificaron cuatro polipéptidos de fusión Fcγ₃R13a-Fc diferentes de acuerdo con este protocolo:

- 20 a) Fcγ₃R13aV158-Avi-Fc LALA P239G (sin sitio de escisión)
 b) Fcγ₃R13aV158-Avi-Fc LALA P239G mínima (sin sitio de escisión)
 c) Fcγ₃R13aV158-Avi-Proteasa PreScission (PP) -Fc LALA P239G
 d) Fcγ₃R13aV158-Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G.

25 Las concentraciones de proteína de los polipéptidos de fusión se determinaron midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos. La pureza y la formación apropiada de dímeros de polipéptidos de fusión se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1, 4-ditiotretol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. El contenido en agregados de las preparaciones de polipéptido de fusión se determinó mediante SEC de alta resolución usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 2000™ (GE Healthcare). La integridad del esqueleto de aminoácidos del polipéptido de fusión reducido se verificó por espectrometría de masas Nano Electrospray QTOF después de la extracción de N-glicanos por tratamiento enzimático con una combinación de neuraminidasa, O-glicanasa y péptido-N-glicosidasa F (Roche Applied Science).

Ejemplo 3

Escisión del polipéptido de fusión que contiene el receptor Fc mediante papaína

35 Los polipéptidos de fusión Fcγ₃R13a-Fc que no comprenden un sitio de escisión enzimática pueden escindirse mediante papaína. El polipéptido de fusión Fcγ₃R13a-Fc se escindió añadiendo cisteína y 0,1 mU/mg de polipéptido de fusión papaína (de *Carica papaya*, Roche Diagnostics GmbH) a 37 °C durante 1 h. La purificación subsiguiente se realizó como se describe en el ejemplo 2. Se muestra un gel SDS-PAGE analítico en la figura 2.

Ejemplo 4

Escisión del polipéptido de fusión que contiene el receptor Fc mediante proteasa Ides

45 La escisión del polipéptido de fusión Fcγ₃R13aV158-Avi-Fc LALA P239G con proteasa Ides es muy ineficiente y, por lo tanto, en este caso no es útil.

Ejemplo 5

Escisión del polipéptido de fusión que contiene el receptor Fc mediante proteasa PreScission

50 Después de diálisis frente a Tris 50 mM, NaCl 150, EDTA 1 mM, DTT 1 mM pH 7,4 el polipéptido de fusión Fcγ₃R13a-(PP)-Fc se escindió añadiendo entre 1-15 U de proteasa PreScission (GE Healthcare)/100 µg de polipéptido de fusión a temperatura ambiente durante la noche. Sólo parte de la proteína podría escindirse. Por otro lado, se observó una escisión inespecífica por la proteasa PreScission del receptor sin sitio de escisión PP.

Ejemplo 6

Escisión del polipéptido de fusión que contiene el receptor Fc mediante proteasa de IgA

60 Después de diálisis frente a Tris 50 mM pH 8 usando un casete de diálisis Slide-a-lyzer, el polipéptido de fusión Fcγ₃R13a-Fc se escindió añadiendo proteasa de IgA (Roche Diagnostics GmbH) a una relación de p (proteasa)/p (polipéptido de fusión) 1:100 a 21 °C durante la noche. La escisión se controló por cromatografía analítica de exclusión por tamaño (SEC, Superdex 75, GE Healthcare). Después de la escisión, el receptor Fcγ₃R13a se separó de la proteasa de IgA por cromatografía de exclusión por tamaño preparativa en Superdex 75™ (GE Healthcare) y de Fc-Tag por HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare). En la figura 3 se muestra un gel SDS-Page analítico.

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

polipéptido de fusión	peso molecular [kDa]	rendimiento después de la captura [mg/l sobrenadante]	Contenido de monómero (SEC) [%]	Rendimiento después de SEC [mg/l sobrenadante]	Rendimiento después de la escisión y posterior purificación [mg/l sobrenadante]
FcgammaRIIIa V158- HisAvi (201)	25,4	3,5	70	1,4	-
FcgammaRIIIa V158- Avi-Fc LALA P329G (0,51)	39	14	70	3 (no activo)	
FcgammaRIIIa V158- Avi-Fc LALA P329G (0,51)	49	80	95	78	21 (sin Avi-tag)
FcgammaRIIIa V158- Avi-PP-Fc LALA P329G (0,51)	50	24	50	no determinado	no determinado
FcgammaRIIIa V158- Avi-IgAP-Fc LALA P329G (9,21)	50	46	90	36	16 (con Avi-tag)

5

Ejemplo 7**Preparación de columna de afinidad con FcgammaRIIIaV158**

10 Se preparó una columna de afinidad con FcgammaRIIIaV158 mediante biotilación *in vitro* del marcador Avi-tag y posterior acoplamiento a Streptavidin sepharose. Esto se puede hacer con el polipéptido de fusión intacto así como con el receptor después de haberse escindido de la región Fc. Es un procedimiento muy rápido y eficiente para preparar una columna de afinidad para propósitos analíticos y preparativos.

Biotilación del receptor

Un dominio extracelular soluble de FcgammaRIIIaV158 con marcador Avi-Tag expresado en células HEK293 se biotiló después de la purificación de acuerdo con el siguiente protocolo: entre 1,2 y 12 mg de FcgammaRIIIaV158 o entre 2,4 y 24 mg de polipéptido de fusión región Fc-FcgammaRIIIaV158 marcado en MOPS 2 mM, NaCl 125 mM pH 7,2, Tween al 0,02 % y 1 comprimido. El inhibidor de proteasa completo (Roche) en 3 ml de PBS se biotiló usando el kit de biotilación de Avidity de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de biotilación se realizó a temperatura ambiente durante la noche. El polipéptido modificado se dializó frente a tampón de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,5 a 4 °C durante la noche para eliminar el exceso de biotina.

Acoplamiento a Streptavidin sepharose

Se añadió 1 g de Streptavidin sepharose (GE Healthcare) al receptor biotilado y dializado, se incubó durante 2 horas mientras se agitaba y finalmente se llenó en una columna XK de 1 ml (GE Healthcare).

Ejemplo 8**Procedimientos de cromatografía que usan un receptor Fc obtenido por expresión de un polipéptido de fusión que contiene un receptor Fc****Condiciones generales:**

Tampón de equilibrado A: Ácido cítrico 20 mM/NaCl 150 mM pH 6,0

Tampón de elución B: Ácido cítrico 20 mM/NaCl 150 mM pH 3,0

Elución: 5 min 100 % de A
en 60 min hasta 100 % de B,

0.1 min 100 % de B,

0.2 6 min 100 % de A

40

Cantidad de la muestra: 50 µg o más

Separación de anticuerpos fucosilados y afucosilados

5 La cromatografía de anticuerpos en la columna con FcγRIIIa permite cuantificar la fracción completamente fucosilada y la fracción afucosilada del anticuerpo. La fracción afucosilada del anticuerpo está correlacionada con ADCC de la preparación de anticuerpos.

10 En la figura 4 se muestra la separación y cuantificación de diferentes formas de glicosilación de un anticuerpo anti-Her (natural, en la parte superior) y un anticuerpo anti-Her diseñado por glicoingeniería en una columna con FcγRIIIa. El tiempo de análisis podría acortarse modificando el gradiente a la vez que se conserva la resolución.

Comparación de la columna de afinidad utilizando FcγRIIIaV158 y FcγRIIIaV158 marcado con Fc

15 Después de acoplar ambas construcciones de receptores en cantidades equimolares, las columnas de afinidad se comportan igual en la separación de anticuerpos completamente fucosilados y afucosilados (figura 5: curva inferior: FcγRIIIaV158; curva superior: FcγRIIIaV158-Fc).

Ejemplo 9

Medición de la interacción FcγRIIIaV158-Avi-proteasa de IgA-Fc LALA P329G-IgG

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

30 Para la determinación de actividad del polipéptido de fusión FcγRIIIaV158-Fc LALA P329G se utilizó un ensayo de unión directa.

35 Alrededor de 400 unidades de resonancia (RU) del sistema de captura (20 µ/ml del kit de captura de Fab humano, GE Healthcare, 28-9583-25) se acoplaron en un chip CM5 (GE Healthcare BR1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de aminos suministrado por GE. La muestra y el tampón del sistema fueron HBS-P + pH 7,4 (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, de tensioactivo P20 al 0,05 % (v/v)). La célula de flujo se ajustó a 25 °C y la muestra se bloqueó a 12 °C. Se capturó un anticuerpo inyectando una solución de 50 nM durante 360 segundos a un caudal de 10 µl/min. La unión se midió por inyección de 50 nM de polipéptido de fusión FcγRIIIa durante 180 s a un caudal de 50 µl/min para la asociación y 360 s para la disociación. La superficie se regeneró en 60 s lavando con solución de glicina pH 2,1 a un caudal de 20 µl/min. Para la evaluación de la actividad de las construcciones se han comparado las alturas de señal y el comportamiento de disociación.

45 Como se muestra en la figura 6, la respuesta del polipéptido de fusión FcγRIIIaV158-Fc LALA P329G muestra más de 100 unidades de respuesta en comparación con el FcγRIIIaV158, con 40 RU.

Ejemplo 10

Medición de la interacción cinética de la IgG del polipéptido de fusión FcγRIIIaV158-Avi-Proteasa de IgA-Fc LALA P329G antes y después de la escisión

50 Para la determinación de la actividad del polipéptido de fusión FcγRIIIaV158-Fc LALA P329G escindido se utilizó un ensayo de unión directa.

55 Alrededor de 400 unidades de resonancia (RU) del sistema de captura (20 µ/ml del kit de captura de Fab humano, GE Healthcare, 28-9583-25) se acoplaron en un chip CM5 (GE Healthcare BR1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de aminos suministrado por GE. La muestra y el tampón del sistema fueron HBS-P + pH 7,4 (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, de tensioactivo P20 al 0,05 % (v/v)). La célula de flujo se ajustó a 25 °C y la muestra se bloqueó a 12 °C. Se capturó un anticuerpo inyectando una solución de 50 nM durante 80 segundos a un caudal de 10 µl/min.

60 Se pasaron diferentes concentraciones de anticuerpos que variaban de 0 a 250 nM (diluciones 1:2) con un caudal de 30 µl/min a través de las células de flujo para medir la asociación a 25 °C durante 120 s. La fase de disociación se vigiló durante 420 s cambiando de la solución patrón al tampón de migración. La superficie se regeneró en 60 s lavando con solución de glicina pH 2,1 a un caudal de 20 µl/min.

65

Las diferencias en el índice de refracción bruto se corrigieron restando la respuesta obtenida de una superficie sin Fc γ RIIIaV158 capturado. Las inyecciones en tampón blanco también se restan (= doble referencia).

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

Ejemplo 11

Generación de los plásmidos de expresión para el polipéptido de fusión Fc-TWEAK

A) Generación del plásmido de expresión para el polipéptido de fusión Fc-TWEAK

El gen de fusión *Fc-TWEAK* se ensambló fusionando fragmentos de ADN sintetizados químicamente que codifican i) una región constante de cadena pesada de Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3; para secuencias ejemplares véase SEQ ID NO: 03 a 17) en la que la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana se truncó (eliminación del último residuo de aminoácido de lisina natural), ii) un conector de glicina-serina que consiste en un Gly₃Ser y una repetición Gly₄Ser (extremo C de cadena pesada-LSPG-GGGSGGGGS-TWEAK), iii) un sitio de escisión de la proteasa PreScission™ (GLEVLFGQP; SEQ ID NO: 61) y iv) un polipéptido TWEAK a partir de los residuos de aminoácidos 106-249 (es decir, excluyendo los dominios intracelular y transmembrana y un sitio de escisión) de una proteína natural TWEAK humana.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria de un polipéptido de fusión Fc-TWEAK en células HEK293 comprendía, además del casete de expresión Fc-TWEAK, un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen de fusión *Fc-TWEAK* comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- una región constante de cadena pesada Fc-gamma -1 humana (bisagra-CH2-CH3),
- un polipéptido TWEAK desde la posición de aminoácido 106-249 de la proteína TWEAK natural, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión maduro Fc-TWEAK se muestra en SEQ ID NO: 62:

```
DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNYHTQKS LSLSPGGGGS GGGSGLEVL FQGPAAIAHY
EVHPRPGQDG AQAGVDGTVS GWEEARINSS SPLRYNRQIG EFIVTRAGLY
YLYCQVHFDE GKAVYKLKLDL LVDGVLALRC LEEFSATAAS SLGPQLRLCQ
VSGLLALRPG SSLRIRTLTPW AHLKAAPFLT YFGLFQVH .
```

B) Generación de los plásmidos de expresión «botón en ojal» para el polipéptido de fusión dimérico Fc-TWEAK (ojal)/Fc (botón)

El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido Fc (ojal) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente en el apartado a). Se diferenció de la secuencia de ADN que codifica la región Fc con mutaciones de ojal T366S, L368A, Y407V, Y349C y las mutaciones que reducen las funciones efectoras de Fc L234A y L235A dentro de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido Fc (ojal) maduro se muestra en SEQ ID NO: 63:

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNYHTQKS LSLSPGK .
```

- El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión Fc-TWEAK (botón) en células HEK293 comprendía, además del casete de expresión Fc (botón), un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen de fusión *Fc-TWEAK* (botón) comprende los siguientes elementos funcionales:
- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
 - una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
 - una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
 - una región constante de cadena pesada Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3) con las mutaciones de botón T366W y S354C y las mutaciones reductoras de las funciones efectoras de Fc L234A y L235A dentro de la región constante de cadena pesada gamma-1 humana,
 - una secuencia conectora del tipo Gly₃Ser-Gly₄Ser y un sitio de escisión de la proteasa PreScission™ (GLEVLFGQP, SEQ ID NO: 41),
 - un polipéptido TWEAK desde la posición de aminoácido 106-249 de la proteína TWEAK natural, y
 - la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión Fc-TWEAK maduro (botón) se muestra en SEQ ID NO: 64:

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGS GGGGSGLEVL FQGPAAIAHY
EVHPRPGQDG AQAGVDGTVS GWEEARINSS SPLRYNRQIG EFIVTRAGLY
YLYCQVHFDE GKAVYKLKLDL LVDGVLALRC LEEFSATAAS SLGPQLRLCQ
VSGLLALRPG SSLRIRTLPW AHLKAAPFLT YFGLFQVH.
```

Ejemplo 12

Generación de los plásmidos de expresión para el polipéptido de fusión Fc-IL17A

a) Generación del plásmido de expresión para el polipéptido de fusión Fc-IL17A

El gen de fusión *Fc-IL17A* se ensambló fusionando fragmentos de ADN sintetizados químicamente que codifican i) una región constante de cadena pesada de Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3; para secuencias ejemplares véase SEQ ID NO: 03 a 17) en la que la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana se truncó (eliminación del último residuo de aminoácido natural de lisina), ii) un conector de glicina-serina que consta de dos repeticiones Gly₄Ser más dos repeticiones Gly₃Ser (extremo C de la cadena pesada-LSP-GGGGSGGGGSGGGGSGGGG-IL17A), o iib) un conector de glicina-serina que consiste en dos repeticiones de Gly₄Ser más un sitio de escisión de la proteasa IgA (extremo C de la cadena pesada-LSP-GGGGSGGGGSGSVVAPPA-IL17A) y iii) un polipéptido IL17A a partir de los residuos de aminoácidos 24-155 (es decir, excluyendo la metionina de partida y el péptido señal homólogo) de una proteína natural IL17A de macaco de Java.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria de un polipéptido de fusión Fc-IL17A en células HEK293 comprendía, además del casete de expresión Fc-IL17A, un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen de fusión *Fc-IL17A* comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- una región constante de cadena pesada Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3),
- un conector de glicina-serina que consiste en dos repeticiones de Gly₄Ser más dos repeticiones de Gly₃Ser o un conector de glicina-serina que consiste en dos repeticiones de Gly₄Ser más un sitio de escisión de la proteasa IgA,
- un polipéptido IL17A desde la posición de aminoácido 24 - 155 de la proteína IL17A natural, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión Fc-IL17A maduro se muestra en SEQ ID NO: 65:

DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGGGS GGGSGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSDYYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRREPRHC,

o

5 SEQ ID NO: 66:

DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGSVV APPAGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSDYYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRREPRHC .

10 b) Generación de los plásmidos de expresión «botón en ojal» para el polipéptido de fusión dimérico Fc-IL17A (botón)/Fc-IL17A (agujero)

15 El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión IL17A-Fc (ojal) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente en el punto a). Se diferenció de la secuencia de ADN que codifica la región Fc con mutaciones de ojal T366S, L368A, Y407V, Y349C y las mutaciones que reducen las funciones efectoras de Fc L234A y L235A dentro de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión IL17A-Fc (ojal) maduro se muestra en SEQ ID NO: 67:

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGSVV APPAGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSDYYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRREPRHC
 PNSFRLEKIL VSVGCTCVTP IVHHVA .

20 El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión Fc-IL17A (botón) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente en el punto a). Se diferenció de la misma en la secuencia de ADN que codifica la región Fc con las mutaciones de botón T366W y S354C y las mutaciones reductoras de las funciones efectoras de Fc L234A y L235A dentro de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana.

25 La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión Fc-IL17A (botón) maduro se muestra en SEQ ID NO: 68:

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGGGS GGGSGIAIPR
 NSGCPNSEDK NFPRTVMVNL NIHNRTSTN PKRSDYYNR STSPWNLHRN
 EDPERYPSVI WEAKCRHLGC VKADGNVDYH MNSVPIQQEI LVLRRREPRHC
 PNSFRLEKIL VSVGCTCVTP IVHHVA .

30 **Ejemplo 13**

Expresión transitoria de los polipéptidos de fusión con Fc

Los polipéptidos de fusión con Fc se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293 (derivadas de línea de células de riñón embrionario 293 humanas) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección «293-Free» (Novagen). Los polipéptidos de fusión con Fc de botón en ojal se expresaron a partir de dos plásmidos diferentes usando una relación de plásmido equimolar tras la transfección. Las transfecciones se realizaron como se especificaba en las instrucciones del fabricante. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular que contenían polipéptido de fusión con Fc siete días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura reducida hasta su purificación.

La información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, en células HEK293 se da en: Meissner, P., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Ejemplo 14**Purificación, procesamiento y caracterización analítica de los polipéptidos de fusión triméricos TWEAK-Fc**

Los sobrenadantes del cultivo que contenían polipéptidos de fusión con Fc se filtraron y purificaron mediante dos etapas cromatográficas. Los sobrenadantes se mezclaron con glicina 2 M al 50 % v/v, pH 8,6, NaCl 600 mM y se capturaron por cromatografía de afinidad utilizando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrada con glicina 1 M, pH 8,6, NaCl 600 mM. Las proteínas no unidas se extrajeron mediante lavado con tampón de equilibrado, y el polipéptido de fusión se recuperó con tampón citrato 0,1 M, pH 3,0, e inmediatamente después de la elución se neutralizó a pH 6,0 con Tris-base 1 M, pH 8,5. Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como segunda etapa de purificación. La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en 2 × PBS (KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 274 mM, KCl 5,4 mM), pH 7,4. Los polipéptidos de fusión con Fc eluidos se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

La concentración de proteína de los polipéptidos de fusión con Fc se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos. La pureza de los polipéptidos de fusión con Fc se analizó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1, 4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. El contenido en agregados y la formación apropiada de trímeros del polipéptido de fusión con Fc se determinó por SEC de alta resolución usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 200™ (GE Healthcare) acoplada a un detector SEC-MALLS (Wyatt). La integridad del esqueleto de aminoácidos del polipéptido de fusión con Fc reducido se verificó por espectrometría de masas Nano Electrospray QTOF después de la extracción de N-glicanos por tratamiento enzimático con una combinación de neuraminidasa, O-glicanasa y péptido-N-glicosidasa F (Roche Applied Science).

Para obtener TWEAK trimérico sin fusión con Fc, el polipéptido de fusión con Fc trimérico se incubó con proteasa PreScission® durante la noche seguido de cromatografía de afinidad usando una columna MabSelectSuRe (GE Healthcare) en modo de flujo continuo para la extracción de polipéptidos de fusión con Fc no escindidos así como la parte de Fc libre. Las fracciones de flujo continuo se purificaron adicionalmente por cromatografía de afinidad en el modo de flujo usando Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) para la extracción de la proteasa PreScission®. Las fracciones de flujo que contenían TWEAK trimérico se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare). La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en 2 × PBS (KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 274 mM, KCl 5,4 mM), pH 7,4. Las fracciones triméricas eluidas que contienen TWEAK se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

La determinación de las concentraciones de proteína, pureza, contenido de agregados, formación de trímeros e integridad del esqueleto de aminoácidos se realizó con los procedimientos descritos anteriormente.

Ejemplo 15**Purificación, procesamiento y caracterización analítica de los polipéptidos de fusión diméricos Fc-IL17**

Los sobrenadantes del cultivo que contenían polipéptidos de fusión con Fc se filtraron y purificaron mediante dos etapas cromatográficas. Los polipéptidos de fusión se capturaron mediante cromatografía de afinidad utilizando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrada con PBS (KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), pH 7,4. Las proteínas no unidas se extrajeron mediante lavado con tampón de equilibrado, y el polipéptido de fusión se recuperó con tampón citrato 0,1 M, pH 2,8, e inmediatamente después de la elución se neutralizó a pH 6,0 con Tris-base 1 M, pH 9,0. Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como segunda etapa de purificación. La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en tampón de histidina 20 mM, NaCl 0,14 M, pH 6,0. Los polipéptidos de fusión con Fc eluidos se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

Las concentraciones de proteína de los polipéptidos de fusión con Fc se determinaron midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos. La pureza y la formación apropiada de dímeros de polipéptidos de fusión con Fc se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1, 4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. El contenido en agregados de las preparaciones de polipéptido de fusión con Fc se determinó mediante SEC de alta resolución usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 2000™ (GE Healthcare). La integridad del esqueleto de aminoácidos del polipéptido de fusión con Fc reducido se verificó por espectrometría de masas Nano Electrospray QTOF después de la extracción de N-glicanos por tratamiento enzimático con una combinación de neuraminidasa, O-glicanasa y péptido-N-glicosidasa F (Roche Applied Science).

Para la activación, el polipéptido de fusión con Fc se formuló en Tris 1 M, pH 7,5 y se incubó con proteasa de IgA. Después de la escisión, se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) para la eliminación de la proteasa de IgA. La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en tampón de histidina 20 mM, NaCl 0,14 M, pH 6,0. Los polipéptidos de fusión con Fc eluidos se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

La determinación de las concentraciones de proteína, la pureza, el contenido de agregados, la eficiencia de disociación y la integridad del esqueleto de aminoácidos se realizó con los procedimientos descritos anteriormente.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla y en la figura 11.

Tabla 3.

	conector largo	conector corto	cConector escindido	cortoConector corto,
Concentración	5,5 mg/ml	5,7 mg/ml	5,8 mg/ml	
cantidad	53,3 mg	68 mg (105,5 mg)	28,4 mg	
% de monómero (SEC)	>98	>98	~96 %	

Ejemplo 16

Generación de los plásmidos de expresión para la expresión del polipéptido de fusión que contiene el receptor IL18

a) Generación del plásmido de expresión para un polipéptido de fusión IL18R-Fc

El gen que codifica el polipéptido de fusión IL18R-Fc se ensambló fusionando fragmentos de ADN sintetizados químicamente que codifican i) una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina (MGWSCIIILFLVATATGVHS: SEQ ID NO: 55), ii) una IL18R humana (excluyendo la metionina de partida) y iii) una región constante de la cadena pesada Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3).

El plásmido de expresión para la expresión transitoria de un polipéptido de fusión IL18R-Fc en células HEK293 comprendía, además del casete de expresión del polipéptido de fusión IL18R-Fc, un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen que codifica el polipéptido de fusión IL18R-Fc comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un IL18R-Fc humano soluble,
- una región constante de cadena pesada Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3), y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión IL18R-Fc maduro se muestra en SEQ ID NO: 70:

SKSCIHRSQI HVVEGEPFYL KPCGISAPVH RNETATMRWF KGSASHEYRE
LNNRSPRVT FHDHTLEFWP VEMEDEGTYY SQVGNDRRNW TLNVTKRNKH
SCFSDKLVTS RDVEVNKSLH ITCKNPNYEE LIQDTWLYKN CKEISKTPRI
LKDAEFGDEG YYSCVFSVHH NGTRYNITKT VNITVIEGRS KVTPAILGPK
CEKVGVELGK DVELNCSASL NKDDLFWYSI RKEDSSDPNV QEDRKETTTW
ISEGKLHASK IILRFQKITEN YLNVLYNCTV ANEEAIDTKS FVLVRKEIPD
IPGHVFTGLE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT
PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL
YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K.

c) Generación de los plásmidos de expresión «botón en ojal» para el polipéptido de fusión monomérico con IL18R

- 5 El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión IL18R-Fc (botón) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente en el punto a). Se diferenció del mismo en la secuencia de ADN que codifica la región Fc con las mutaciones de botón T366W y S354C dentro de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana.
- 10 El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de la región Fc (ojal) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente en el punto a). Se diferenció del mismo en la secuencia de ADN que codifica la región Fc con mutaciones de ojal T366S, L368A, Y407V e Y349C dentro de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana.
- 15 El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión IL18R-Fc (botón/ojal) en HEK293 comprendía además del casete de expresión del polipéptido de fusión (botón/ojal) un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen que codifica el polipéptido de fusión (botón/ojal) comprende los siguientes elementos funcionales:
- 20 - el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- una región constante de cadena pesada Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3) con las mutaciones de ojal T366S, L368A, Y407V e Y349C o las mutaciones de botón T366W y S354C dentro de la región constante de cadena pesada gamma-1 humana, y
- 25 - la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

Ejemplo 17

30 Expresión transitoria, purificación y caracterización analítica del polipéptido de fusión IL18R-Fc

Los polipéptidos de fusión se obtuvieron por transfección transitoria de células HEK293 (derivadas de línea celular de riñón embrionario humano 293) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección «293-Free» (Novagen). Los pares de polipéptidos de fusión de botón en ojal se expresaron a partir de dos plásmidos diferentes usando una relación de plásmido equimolar tras la transfección. Las transfecciones se realizaron como se especificaba en las instrucciones del fabricante. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular que contenían polipéptido de fusión siete días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura reducida hasta su purificación.

- 40 La información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, en células HEK293 se da en: Meissner, P., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Los sobrenadantes del cultivo que contienen polipéptido de fusión se filtraron y purificaron mediante dos etapas cromatográficas. Los polipéptidos de fusión se capturaron mediante cromatografía de afinidad utilizando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrada con PBS (KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HP0₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), pH 7,4. Las proteínas no unidas se extrajeron mediante lavado con tampón de equilibrado, y el polipéptido de fusión se recuperó con tampón citrato 0,05 M, pH 3, inmediatamente después de la elución se neutralizó a pH 6,5 con Tris-base 1 M, pH 9,0. Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como segunda etapa de purificación. La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó en tampón MOPS 2 mM, NaCl 0,125 M, pH 7,2.

50 Los polipéptidos de fusión eluidos se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

Las concentraciones de proteína de los polipéptidos de fusión se determinaron midiendo la densidad óptica (DO) a

- 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos. La pureza y la formación apropiada de dímeros de polipéptidos de fusión se analizaron mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1, 4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. El contenido en agregados de las preparaciones de polipéptido de fusión se determinó mediante SEC de alta resolución usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 2000™ (GE Healthcare). La integridad del esqueleto de aminoácidos del polipéptido de fusión reducido se verificó por espectrometría de masas Nano Electrospray QTOF después de la extracción de N-glicanos por tratamiento enzimático con una combinación de neuraminidasa, O-glicanasa y péptido-N-glicosidasa F (Roche Applied Science).
- Los respectivos sensogramas SPR se muestran en la figura 17 que muestran las diferencias entre monómero y dímero (efectos de avidéz).

Ejemplo 18

15 Generación de los plásmidos de expresión para el polipéptido de fusión región Fc-sitio de escisión de proteasa precisión-shTNFalfa

a) Generación del plásmido de expresión para el polipéptido de fusión Fc-shTNFalfa

- El gen de fusión Fc-PP-shTNFalfa se ensambló fusionando fragmentos de ADN sintetizados químicamente que codifican i) una región constante de cadena pesada Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3; para secuencias ejemplares véase SEQ ID NO: 03 a 17) en la que la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana se truncó (eliminación del último residuo de aminoácido de lisina natural), ii) un conector de glicina-serina que consiste en un Gly₃Ser y una repetición Gly₄Ser (extremo C de cadena pesada-LSPG-GGGSGGGGS-TWEAK), iii) un sitio de escisión de la proteasa PreScission™ (GLEVLFGQP; SEQ ID NO: 61) y iv) un polipéptido de shTNFalfa (excluyendo los dominios intracelular y transmembrana y un sitio de escisión) de una proteína natural de TNFalfa humana.

- El plásmido de expresión para la expresión transitoria de un polipéptido de fusión Fc-PP-shTNFalfa en células HEK293 comprendía, además del casete de expresión Fc-PP-shTNFalfa, un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen de fusión *Fc-PP-shTNFalfa* comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- una región constante de cadena pesada Fc-gamma -1 humana (bisagra-CH2-CH3),
- un polipéptido de shTNFalfa, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

- La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión Fc-PP-shTNFalfa maduro se muestra en la SEQ ID NO: 71:

```
DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGS GGGSGGLEVL FQGPVRSRR
TPSDKPVAHV VANPQAEQQL QWLNRRANAL LANGVELRDN QLVVPSEGLY
LIYSQVLFKG QGCPSTHVLL THTISRIAVS YQTKVNLLSA IKSPCQRETP
EGAEAKPWYE PIYLGGVFQL EKGDRLSAEI NRPDYLDFAE SGQVYFGIIA
L.
```

bB) Generación de los plásmidos de expresión «botón en ojal» para el polipéptido de fusión dimérico Fc (ojal)/Fc-PP-shTNFalfa (botón)

- El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido con la región Fc (ojal) en células HEK293 se derivó del vector de expresión descrito anteriormente. Se diferenció de la secuencia de ADN que codifica la región Fc con mutaciones de ojal T366S, L368A, Y407V, Y349C y las mutaciones que reducen las funciones efectoras de Fc L234A y L235A dentro de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región Fc madura (agujero) se muestra en la SEQ ID NO: 69:

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSRDELTK NQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK.

El plásmido de expresión para la expresión transitoria del polipéptido de fusión Fc-PP-shTNFalfa (botón) en células HEK293 comprendía, además del casete de expresión Fc (botón), un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. En detalle, la unidad de transcripción del gen de fusión *Fc-PP-shTNFalfa* (botón) comprende los siguientes elementos funcionales:

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- una región constante de cadena pesada Fc-gamma-1 humana (bisagra-CH2-CH3) con las mutaciones de botón T366W y S354C y las mutaciones reductoras de las funciones efectoras de Fc L234A y L235A dentro de la región constante de cadena pesada gamma-1 humana,
- una secuencia conectora del tipo Gly₃Ser-Gly₄Ser y un sitio de escisión de proteasa PreScission™ (GLEVLFGQP),
- un polipéptido PP-shTNFalfa, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia señal de poli A de BGH).

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión Fc-PP-shTNFalfa (botón) maduro se muestra en la SEQ ID NO: 72:

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPCRDELTK NQVSLWCLVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGS GGGGSGLEVL FQGPVRSR
 TPSDKPVAHV VANPQAEQQL QWLNRRANAL LANGVELRDN QLVVPSEGLY
 LIYSQVLFKG QGCPSTHVL L THTISRIAVS YQTKVNLLSA IKSPCQRETP
 EGAEAKPWYE PIYLGGVFQ L EKGDRLSAEI NRPDYLDFAE SGQVYFGIIA
 L.

Ejemplo 19

25 Purificación, procesamiento y caracterización analítica de los polipéptidos de fusión triméricos Fc-PP-shTNFalfa

Los sobrenadantes del cultivo que contenían polipéptidos de fusión con Fc se filtraron y purificaron mediante dos etapas cromatográficas. Los sobrenadantes se mezclaron con glicina 2 M al 50 % v/v, pH 8,6, NaCl 600 mM y se capturaron por cromatografía de afinidad utilizando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrada con glicina 1 M, pH 8,6, NaCl 600 mM. Las proteínas no unidas se extrajeron mediante lavado con tampón de equilibrado, y el polipéptido de fusión se recuperó con tampón citrato 0,1 M, pH 3,0, e inmediatamente después de la elución se neutralizó a pH 6,0 con Tris-base 1 M, pH 8,5. Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como segunda etapa de purificación. La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en 2 × PBS (KH₂P0₄ 2 mM, Na₂HP0₄ 20 mM, NaCl 274 mM, KCl 5,4 mM), pH 7,4. Los polipéptidos de fusión con Fc eluidos se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

La concentración de proteína de los polipéptidos de fusión Fc se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos. La pureza de los polipéptidos de fusión con Fc se analizó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1, 4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. El contenido en agregados y la formación apropiada de trímeros del polipéptido de fusión con Fc se determinó por SEC de alta resolución usando una columna analítica de exclusión por tamaño Superdex 200™ (GE Healthcare) acoplada a un detector SEC-MALLS (Wyatt). La integridad del esqueleto de aminoácidos del polipéptido de fusión con Fc reducido se verificó por espectrometría de masas Nano Electrospray QTOF después de la extracción de N-glicanos por tratamiento enzimático con una combinación de neuraminidasa, O-glicanasa y péptido-N-glicosidasa F (Roche Applied Science).

Para obtener PP-shTNFalfa trimérico sin fusión con Fc, el polipéptido de fusión con Fc trimérico se incubó con proteasa PreScission® durante la noche seguido de cromatografía de afinidad usando una columna MabSelectSuRe (GE

- Healthcare) en modo de flujo continuo para la extracción de polipéptidos de fusión con Fc no escindidos así como la parte de Fc libre. Las fracciones de flujo continuo se purificaron adicionalmente por cromatografía de afinidad en el modo de flujo usando Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) para la extracción de la proteasa PreScission®. Las fracciones de flujo que contenían PP-shTNFalfa trimérico se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare). La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en 2 x PBS (KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 274 mM, KCl 5,4 mM), pH 7,4. Las fracciones triméricas eluídas que contienen PP-shTNFalfa se concentraron con una unidad de filtro centrifugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.
- 10 La determinación de las concentraciones de proteína, pureza, contenido de agregados, formación de trímeros e integridad del esqueleto de aminoácidos se realizó con los procedimientos descritos anteriormente.
- 15 TNF alfa como polipéptido de fusión de IgG1-LALA-Fc-KiH_sitio de proteasa PreScission_shTNFa se obtuvo por expresión transitoria en células HEK 293 a 283 mg/l. La escisión por la proteasa PreScission dio como resultado 15 mg por 100 mg de polipéptido de fusión (total de 283 mg = 43 mg). Evaluación funcional en el ensayo A375 (véase el ejemplo 20).

Ejemplo 20

20 Titulación de TNF alfa humano

- Se sembraron células A-375 con 2×10^4 células por pocillo en 200 μ l por pocillo en placa de cultivo celular de 96 pocillos F (Costar 3596). Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 % antes de extraer el medio.
- 25 Las siguientes citocinas se valoraron con 100 μ l por pocillo (50-0 nM)
 - rhTNF- a (R & D Systems 210-TA/CF),
 - hTNFalfa-Fc tal como se describe en el presente documento, y
 - polipéptido de fusión hTNFalfa-Fc.
- 30 Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. El sobrenadante se transfirió a una placa RB de 96 pocillos y se conservó a -20 °C. El perfil de citocinas se analizó utilizando hIL-8 (BD 558277) CBA Flex Set.

muestra	CE50 [nM]
hTNF-a R&D	0,005
HTNF-a-hFc	0,078
HTNF-a escindido	0,009

Las curvas de titulación se muestran en la figura 0.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Método para producir moléculas monoméricas y multiméricas y sus usos
 <130> 31134 WO

10 <150> Documento EP12179021
 <151> 2-8-2012
 <160> 72

15 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

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

Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Glu Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 65 70 75 80

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 85 90 95

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105

25 <210> 2
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 2

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

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

ES 2 633 894 T3

130

135

140

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 4

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 633 894 T3

100

105

110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

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

<220>
<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación de agujero

<400> 5

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 6

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación botón

<400> 6

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

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

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

5

10

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

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

<220>
 <223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y mutación de agujero

<400> 7

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 8

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y mutación botón

5

ES 2 633 894 T3

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

ES 2 633 894 T3

<210> 9
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P329G

<400> 9

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

ES 2 633 894 T3

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 10

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y mutación P329G

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 11

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P329G y de agujero

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 12

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación P329G y de botón

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 13

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 13

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 14

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG1 con una mutación L234A, L235A, P329G y botón

<400> 14

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

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

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

5

10

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

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

<400> 15

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

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

5

10

ES 2 633 894 T3

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

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

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

<400> 16

ES 2 633 894 T3

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

<210> 17
 <211> 229
 <212> PRT

ES 2 633 894 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de la región Fc humana del isotipo IgG4 con una mutación S228P, L235E y P329

5

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys
 225

ES 2 633 894 T3

<210> 18
 <211> 191
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18
 Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln
 1 5 10 15
 Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly
 20 25 30
 Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser
 35 40 45
 Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val
 50 55 60
 Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser
 65 70 75 80
 Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala
 85 90 95
 Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His
 100 105 110
 Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly
 115 120 125
 Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys
 130 135 140
 Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly
 145 150 155 160
 Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly
 165 170 175
 Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 180 185 190

10 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> marcado Arg

ES 2 633 894 T3

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

5 <210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> marcado Arg 2

<400> 20

Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

15 <210> 21
<211> 15
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> marcado Avi

25 <400> 21

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

30 <210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> marcado His-Avi

<400> 22

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

Ile Glu Trp His Glu
20

40 <210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> marcado His

<400> 23

50 **His His His His His His**
1 5

<210> 24
<211> 19
55 <212> PRT

<400> 28

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5

5 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> marcado de aminoácido

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> marcado de aminoácido

25 <400> 30

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

30 <210> 31
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> marcado de aminoácido

<400> 31

Met Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 40 1 5 10 15
Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
 20 25 30

Gln Gly Gln Arg Glu Pro
 35

45 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> marcado de aminoácido

<400> 32

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

ES 2 633 894 T3

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> marcado de aminoácido

 10 <400> 33

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

 <210> 34
 15 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> marcado de aminoácido

 <400> 34

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

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

 25 <210> 35
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> marcado de aminoácido

 <400> 35

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

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

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

 <210> 36
 <211> 32
 40 <212> PRT
 <213> Butyrivibrio fibrisolvens

 <400> 36

ES 2 633 894 T3

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

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

5 <210> 37
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> dominio de unión chiting
 <400> 37

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

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

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

Gln Leu Gln
 50

15 <210> 38
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Chondrus crispus

20 <400> 38

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 39
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 39

5

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

10

<400> 40

Pro Ala Pro Ser Pro

1 5

15

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> sitio de escisión de proteasa

<400> 41

25

Pro Pro Ser Pro

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> sitio de escisión de proteasa

 <400> 42

Pro Pro Ala Pro
1
 10
 <210> 43
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> sitio de escisión de proteasa

 <400> 43
 20
Pro Pro Thr Pro
1

 <210> 44
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sitio de escisión de proteasa
 30
 <400> 44

Pro Pro Gly Pro
1
 35
 <210> 45
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sitio de escisión enzimática

 <400> 45

Pro Arg Pro Pro Thr Pro
1 5
 45

 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sitio de escisión enzimática

 <400> 46
 55

Val Val Ala Pro Pro Ala Pro
1 5

 <210> 47
 60 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sitio de escisión enzimática

<400> 47

Val Val Ala Pro Pro Ser Pro
1 5

10

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

15

<220>
 <223> sitio de escisión enzimática

<400> 48

20

Val Val Ala Pro Pro Thr Pro
1 5

<210> 49
 <211> 7

25

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sitio de escisión enzimática

30

<400> 49

Val Val Ala Pro Pro Gly Pro
1 5

35

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

40

<220>
 <223> sitio de escisión enzimática

<400> 50

45

Pro Arg Pro Pro Thr Pro
1 5

<210> 51
 <211> 6

50

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sitio de escisión enzimática

55

<400> 51

Ala Pro Pro Ala Ala Pro
1 5

60

<210> 52
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> sitio de escisión enzimática

<400> 52

Pro Arg Pro Pro Ala Pro
1 5

10 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> sitio de escisión enzimática

<400> 53

20 **Pro Arg Pro Pro Ser Pro**
1 5

<210> 54
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sitio de escisión enzimática

30 <400> 54

Pro Arg Pro Pro Gly Pro
1 5

35 <210> 55
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <400> 55

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

Val His Ser

<210> 56
 45 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> polipéptido de fusión FcyRIIIaV158-Avi-proteasa IgA -Fc LALA P239G maduro

<400> 56

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

				165						170						175
Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln	
			180					185					190			
Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	Glu	Leu	
		195					200					205				
Val	Val	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Glu	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
	210					215					220					
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
225					230					235					240	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
				245					250					255		
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
			260					265					270			
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
		275					280						285			
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
	290					295					300					
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
305					310					315					320	
Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
				325					330					335		
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	
			340					345						350		
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
		355					360					365				
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
	370					375					380					
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
385					390					395					400	
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
				405					410					415		

ES 2 633 894 T3

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

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

<210> 57

<211> 436

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión FcyRIIIa-LR (H131) -Avi-proteasa IgA-Fc LALA P239G

<400> 57

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

Ser Pro Gly Lys
435

<210> 58
<211> 423
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> polipéptido de fusión FcyRIIbV158-Avi-IgA Proteasa-Fc LALA P239G

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420

<210> 59
 <211> 443
 <212> PRT

ES 2 633 894 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión FcyRIIIb-Avi-proteasa IgA- Fc LALA P239G

5

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 60

<211> 346

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión FcgammaRIIIa-Avi-Fc LALA p239G mínimo

10

ES 2 633 894 T3

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sitio de escisión de proteasa de precisión
 <400> 61

Gly Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
 1 5

<210> 62
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido de fusión Fc-TWEAK maduro
 <400> 62

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Glu Val Leu
 225 230 235 240

Phe Gln Gly Pro Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro
 245 250 255

Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp
 260 265 270

Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln
 275 280 285

Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys
 290 295 300

ES 2 633 894 T3

Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu
305 310 315 320

Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala
325 330 335

Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser
340 345 350

Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu
355 360 365

Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu
370 375 380

Phe Gln Val His
385

<210> 63
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido Fc maduro (agujero)

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 64
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido de fusión (botón) Fc-TWEAK maduro

<400> 64

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Glu Val Leu
225 230 235 240

Phe Gln Gly Pro Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro
245 250 255

Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp
260 265 270

Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln
275 280 285

Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys
290 295 300

Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu
305 310 315 320

Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala
325 330 335

ES 2 633 894 T3

Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser
 340 345 350

Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu
 355 360 365

Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu
 370 375 380

Phe Gln Val His
 385

<210> 65

<211> 350

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión Fc-IL17A maduro

<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn
245 250 255

Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile
260 265 270

His Asn Arg Asn Thr Ser Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr
275 280 285

Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu
290 295 300

Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys
305 310 315 320

Val Lys Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile
325 330 335

Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys
340 345 350

<210> 66

<211> 350

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión Fc-IL17A maduro

<400> 66

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

ES 2 633 894 T3

Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile
 260 265 270

His Asn Arg Asn Thr Ser Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr
 275 280 285

Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu
 290 295 300

Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys
 305 310 315 320

Val Lys Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile
 325 330 335

Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys
 340 345 350

<210> 67
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptido de fusión (botón) IL17A - Fc
 <400> 67

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

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

ES 2 633 894 T3

	115					120										125
Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
	130					135					140					
Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
145					150					155					160	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
				165					170					175		
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			180					185					190			
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
		195					200					205				
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	210				215						220					
Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Val	
225					230					235					240	
Ala	Pro	Pro	Ala	Gly	Ile	Ala	Ile	Pro	Arg	Asn	Ser	Gly	Cys	Pro	Asn	
				245					250					255		
Ser	Glu	Asp	Lys	Asn	Phe	Pro	Arg	Thr	Val	Met	Val	Asn	Leu	Asn	Ile	
			260					265					270			
His	Asn	Arg	Asn	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Arg	Ser	Ser	Asp	Tyr	Tyr	
		275					280					285				
Asn	Arg	Ser	Thr	Ser	Pro	Trp	Asn	Leu	His	Arg	Asn	Glu	Asp	Pro	Glu	
	290					295					300					
Arg	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Trp	Glu	Ala	Lys	Cys	Arg	His	Leu	Gly	Cys	
305					310					315					320	
Val	Lys	Ala	Asp	Gly	Asn	Val	Asp	Tyr	His	Met	Asn	Ser	Val	Pro	Ile	
				325					330					335		
Gln	Gln	Glu	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Arg	Glu	Pro	Arg	His	Cys	Pro	Asn	
			340					345					350			
Ser	Phe	Arg	Leu	Glu	Lys	Ile	Leu	Val	Ser	Val	Gly	Cys	Thr	Cys	Val	
		355					360					365				

ES 2 633 894 T3

Thr Pro Ile Val His His Val Ala
370 375

<210> 68
<211> 376
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido de fusión (botón) Fc-IL17A maduro
<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

195

200

205

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly Cys Pro Asn
245 250 255

Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile
260 265 270

His Asn Arg Asn Thr Ser Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr
275 280 285

Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu
290 295 300

Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys
305 310 315 320

Val Lys Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile
325 330 335

Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His Cys Pro Asn
340 345 350

Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val
355 360 365

Thr Pro Ile Val His His Val Ala
370 375

<210> 69
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido de región (botón) Fc maduro

<400> 69

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 70
<211> 541
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polipéptido de fusión IL18R-Fc

10 <400> 70

ES 2 633 894 T3

Ser Lys Ser Cys Ile His Arg Ser Gln Ile His Val Val Glu Gly Glu
1 5 10 15

Pro Phe Tyr Leu Lys Pro Cys Gly Ile Ser Ala Pro Val His Arg Asn
20 25 30

Glu Thr Ala Thr Met Arg Trp Phe Lys Gly Ser Ala Ser His Glu Tyr
35 40 45

Arg Glu Leu Asn Asn Arg Ser Ser Pro Arg Val Thr Phe His Asp His
50 55 60

Thr Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Met Glu Asp Glu Gly Thr Tyr Ile
65 70 75 80

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

Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Ser Asp Lys Leu Val Thr Ser Arg Asp
100 105 110

Val Glu Val Asn Lys Ser Leu His Ile Thr Cys Lys Asn Pro Asn Tyr
115 120 125

Glu Glu Leu Ile Gln Asp Thr Trp Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Glu Ile
130 135 140

Ser Lys Thr Pro Arg Ile Leu Lys Asp Ala Glu Phe Gly Asp Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Tyr Ser Cys Val Phe Ser Val His His Asn Gly Thr Arg Tyr Asn
165 170 175

Ile Thr Lys Thr Val Asn Ile Thr Val Ile Glu Gly Arg Ser Lys Val
180 185 190

Thr Pro Ala Ile Leu Gly Pro Lys Cys Glu Lys Val Gly Val Glu Leu
195 200 205

Gly Lys Asp Val Glu Leu Asn Cys Ser Ala Ser Leu Asn Lys Asp Asp
210 215 220

Leu Phe Tyr Trp Ser Ile Arg Lys Glu Asp Ser Ser Asp Pro Asn Val
225 230 235 240

Gln Glu Asp Arg Lys Glu Thr Thr Thr Trp Ile Ser Glu Gly Lys Leu
245 250 255

ES 2 633 894 T3

His Ala Ser Lys Ile Leu Arg Phe Gln Lys Ile Thr Glu Asn Tyr Leu
 260 265 270

Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Asn Glu Glu Ala Ile Asp Thr
 275 280 285

Lys Ser Phe Val Leu Val Arg Lys Glu Ile Pro Asp Ile Pro Gly His
 290 295 300

Val Phe Thr Gly Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 305 310 315 320

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 325 330 335

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 340 345 350

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 355 360 365

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 370 375 380

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 385 390 395 400

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 405 410 415

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 420 425 430

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 435 440 445

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 450 455 460

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 465 470 475 480

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 485 490 495

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

ES 2 633 894 T3

500

505

510

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 515 520 525

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 530 535 540

<210> 71

<211> 401

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión Fc-PP-shTNFalfa

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Glu Val Leu
 225 230 235 240

Phe Gln Gly Pro Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
 245 250 255

Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 260 265 270

Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
 275 280 285

Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 290 295 300

Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 305 310 315 320

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
 325 330 335

Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
 340 345 350

Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
 355 360 365

Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 370 375 380

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 385 390 395 400

Leu

- <210> 72
- <211> 401
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 633 894 T3

<220>

<223> polipéptido de fusión (botón) Fc -PP -shTNFalfa

5 <400> 72

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 633 894 T3

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Glu Val Leu
 225 230 235 240

Phe Gln Gly Pro Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro
 245 250 255

Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp
 260 265 270

Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg
 275 280 285

Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 290 295 300

Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 305 310 315 320

Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn
 325 330 335

Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly
 340 345 350

Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe
 355 360 365

Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp
 370 375 380

Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
 385 390 395 400

Leu

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la producción de un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada que comprende las siguientes etapas

10 a) cultivar una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II

$$B_n-CS_o-I_s-CS_p-FC^1-CS_q-I_r-CS_r-B_m : FC^2 \quad (\text{fórmula II})$$

en la que

15 B designa un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC¹ denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

20 FC² indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

25 en la que n = 1 y m = 0, o n = 0 y m = 1,

en la que si n = 1 entonces o = 0 o 1, y si o = 0 entonces p = 0 o 1, y si o = 1 entonces p = 0 y s = 0 o 1 y q = 0 y t = 0 y r = 0,

30 en la que si m = 1 entonces q = 0 o 1, y si q = 0 entonces r = 0 o 1, y si q = 1 entonces r = 0 y t = 0 o 1 y o = 0 y s = 0, y p = 0,

en la que FC¹ y FC² están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro (:),

35 en la que FC¹ y FC² no se unen sustancialmente a un receptor Fc,

b) recuperar el polipéptido de fusión de la célula o del medio de cultivo,

40 c) escindir el polipéptido de fusión con una proteasa,

y producir de este modo un polipéptido que es biológicamente activo como 2-mérico o 3-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada.

45 2. Un polipéptido de fusión de acuerdo con la fórmula II

$$B_n-CS_o-I_s-CS_p-FC^1-CS_q-I_r-CS_r-B_m : FC^2 \quad (\text{fórmula II})$$

en la que

50 B designa un polipéptido que es biológicamente activo como n-mérico y forma agregados/multímeros no definidos tras la expresión en ausencia de una región Fc fusionada,

FC¹ denota un primer polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

55 FC² indica un segundo polipéptido de la región Fc de la cadena pesada,

CS denota un sitio de escisión e

60 I denota una secuencia de aminoácidos intercalada,

en la que n = 1 y m = 0, o n = 0 y m = 1,

en la que si n = 1 entonces o = 0 o 1, y si o = 0 entonces p = 0 o 1, y si o = 1 entonces p = 0 y s = 0 o 1 y q = 0 y t = 0 y r = 0,

65

en la que si $m = 1$ entonces $q = 0$ o 1 , y si $q = 0$ entonces $r = 0$ o 1 , y si $q = 1$ entonces $r = 0$ y $t = 0$ o 1 y $o = 0$ y $s = 0$, y $p = 0$,

en la que el primer FC y el segundo FC están unidos covalentemente por uno o más enlaces disulfuro,

5

en la que FC1 y FC2 no se unen sustancialmente a un receptor Fc.

3. Un polipéptido 2-mérico o 3-mérico obtenido por un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1.

10

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o el polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 2 o el polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque B se selecciona del grupo de IL17, TWEAK, TNF y otros miembros de la familia de TNF, TLLa, IL18, IL18R, IL33 e IL33R.

15

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 4 o el polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 2 o 4, caracterizado porque FC es una variante de un polipéptido de cadena pesada seleccionado del grupo de polipéptido de cadena pesada de IgG1 humano, polipéptido de cadena pesada de IgG2 humana, IgG3 humana Polipéptido de cadena pesada, polipéptido de cadena pesada de IgG4 humana, polipéptido de cadena pesada de IgG1 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG2 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG3 murina, polipéptido de cadena pesada de IgG de conejo.

20

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 5 o el polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5, caracterizado porque FC se selecciona del polipéptido de cadena pesada de IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G, polipéptido de cadena pesada IgG4 humana con la mutación S228P, L235E y P329G.

25

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5 o 6 o el polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 o 6, caracterizado porque el primer FC comprende la mutación T366W y opcionalmente la mutación S354C y la segundo FC comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V y opcionalmente la mutación Y349C.

30

8. Uso de un polipéptido de fusión inmovilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 como ligando en cromatografía de afinidad.

35

9. Uso de un polipéptido de fusión inmovilizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 en un inmunoensayo.

40

10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, caracterizado porque el polipéptido de fusión o el polipéptido 2-mérico o 3-mérico se une a una fase sólida.

11. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o un polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4.

45

12. Uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 en la producción de un medicamento.

50

13. Uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 como inmunógeno, por el que el uso excluye modelos animales humanos o procedimientos de tratamiento.

55

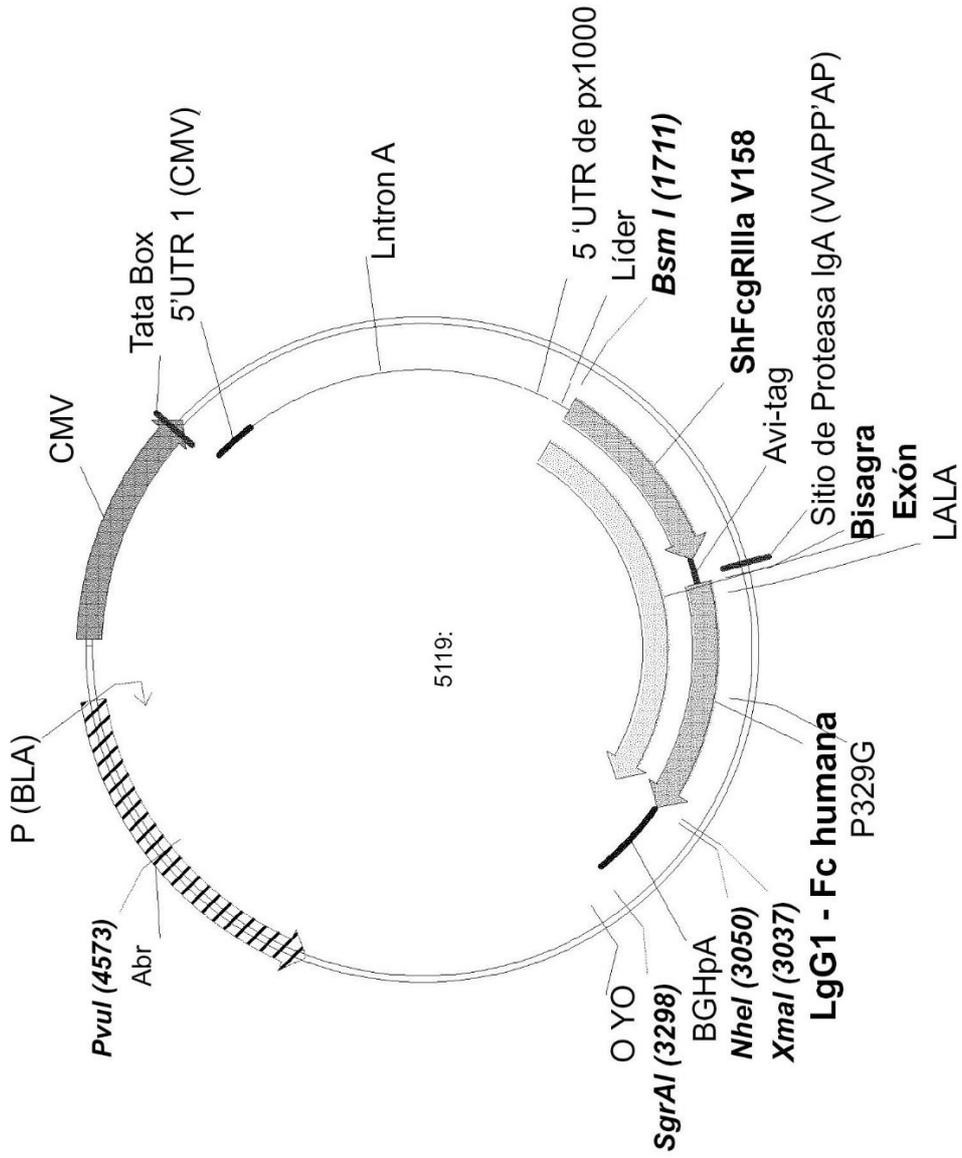
14. Uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 para obtener un modelo animal no humano de una enfermedad aplicando el polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o el polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 a un animal experimental.

60

15. Uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o de un polipéptido 2-mérico o 3-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 para seleccionar un anticuerpo que se une específicamente a B o un 2-mérico o 3-mérico de B.

16. Uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 o de un polipéptido 2-mérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 para producir un 2-mérico enlazado por disulfuro de B.

Fig. 1



7025 shFcgRIIIa - V158 Avi IgAP IgG1 - Fc LALA P329G

Fig. 2

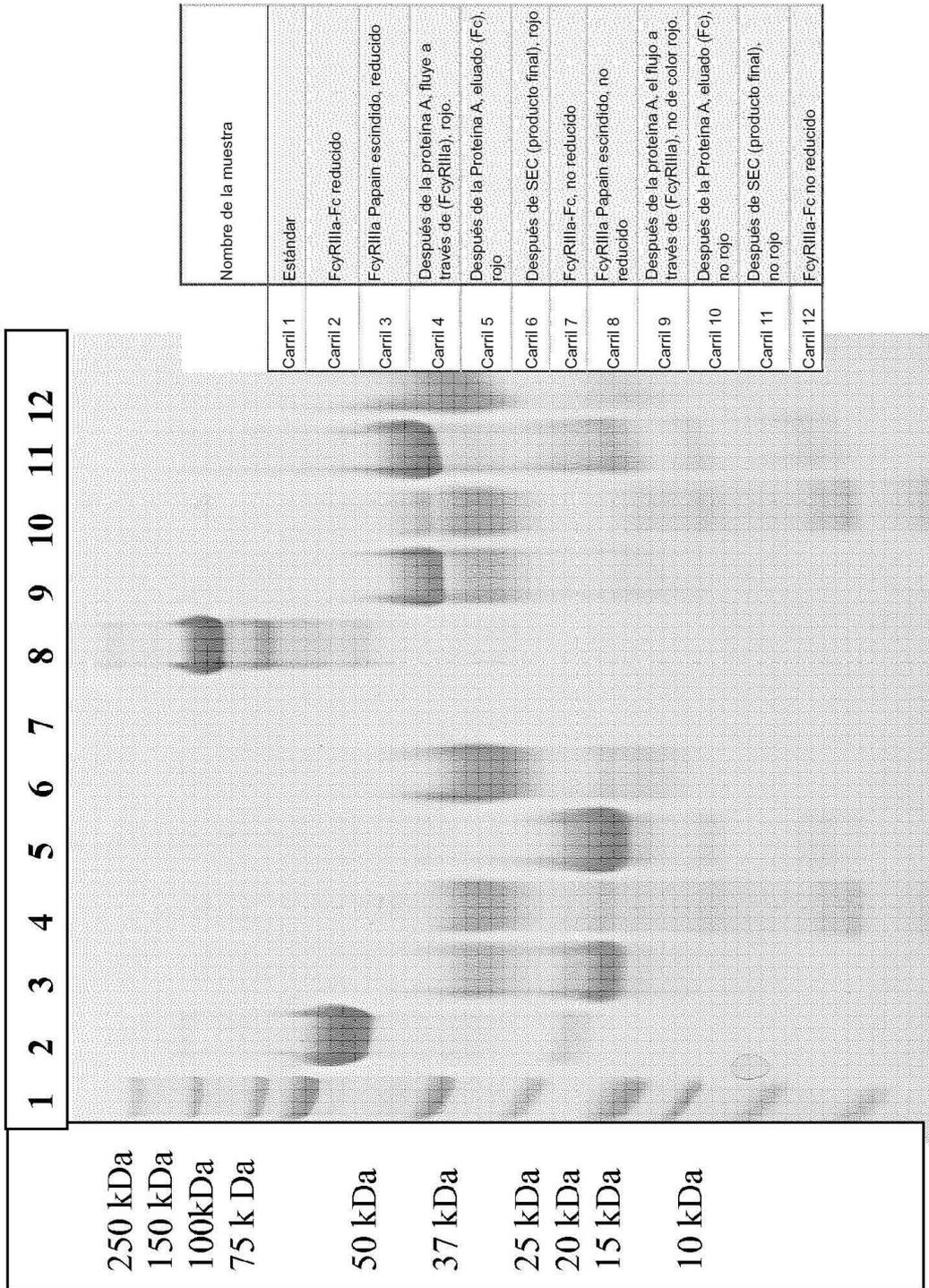


Fig. 3

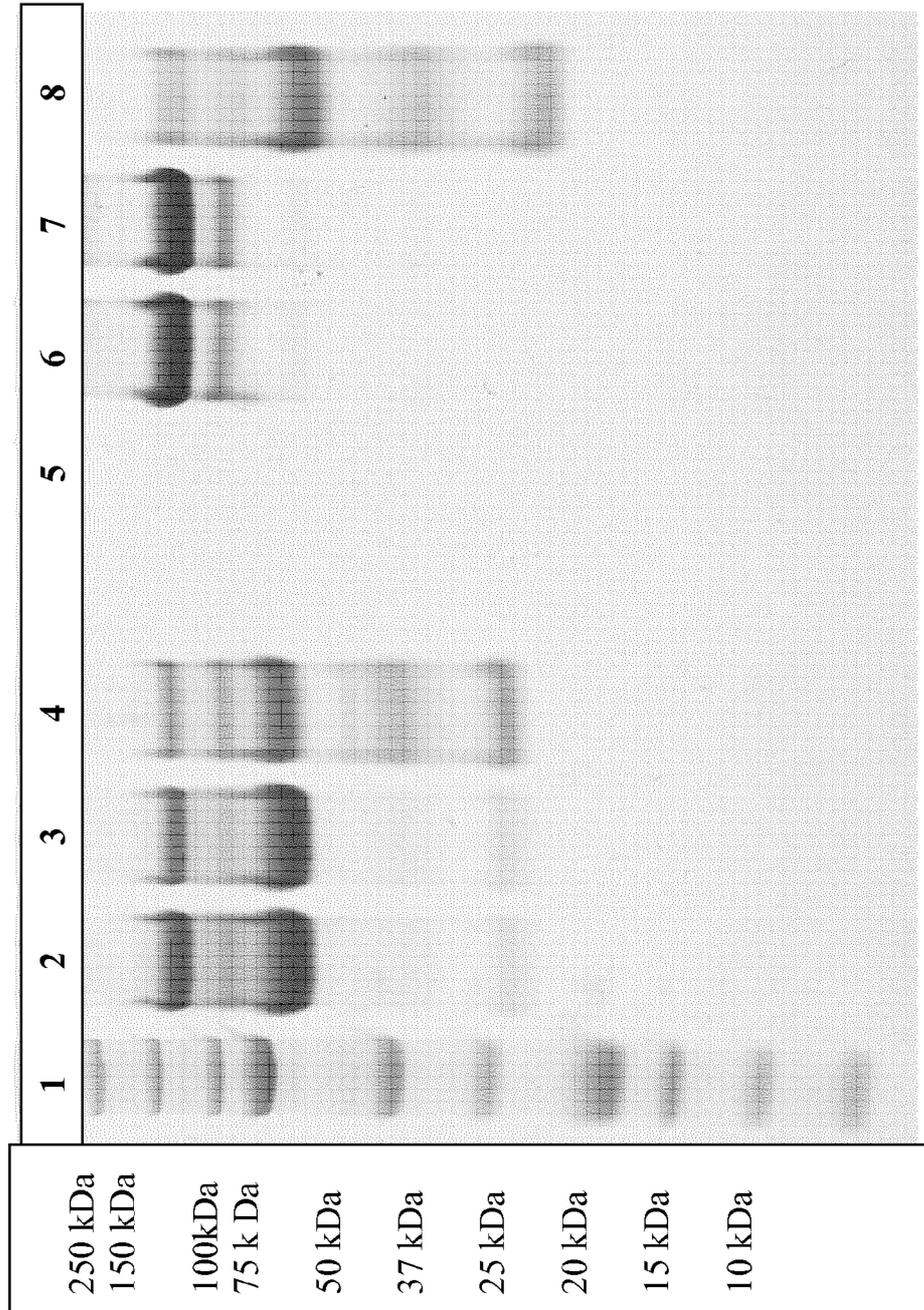


Fig. 4

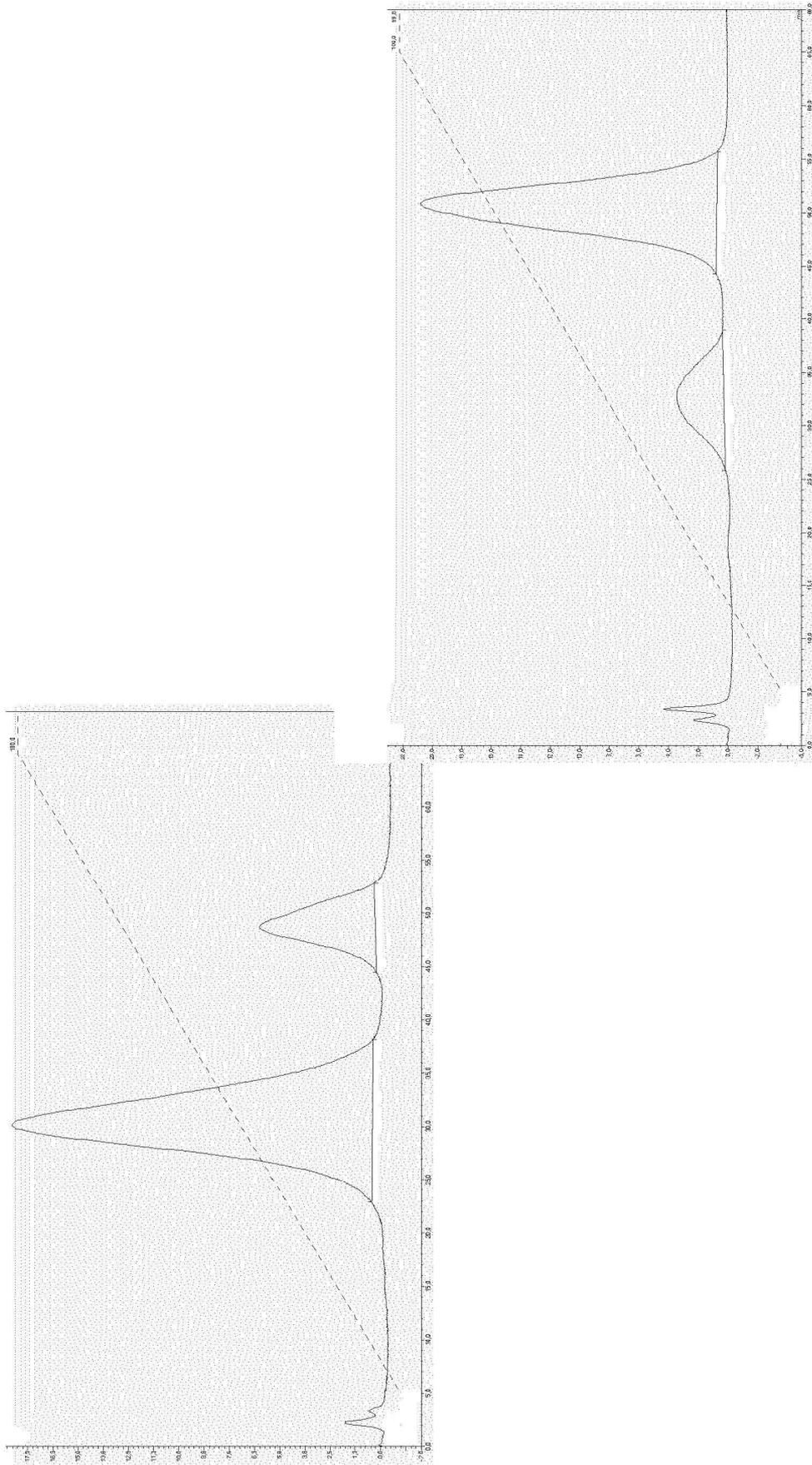


Fig. 5

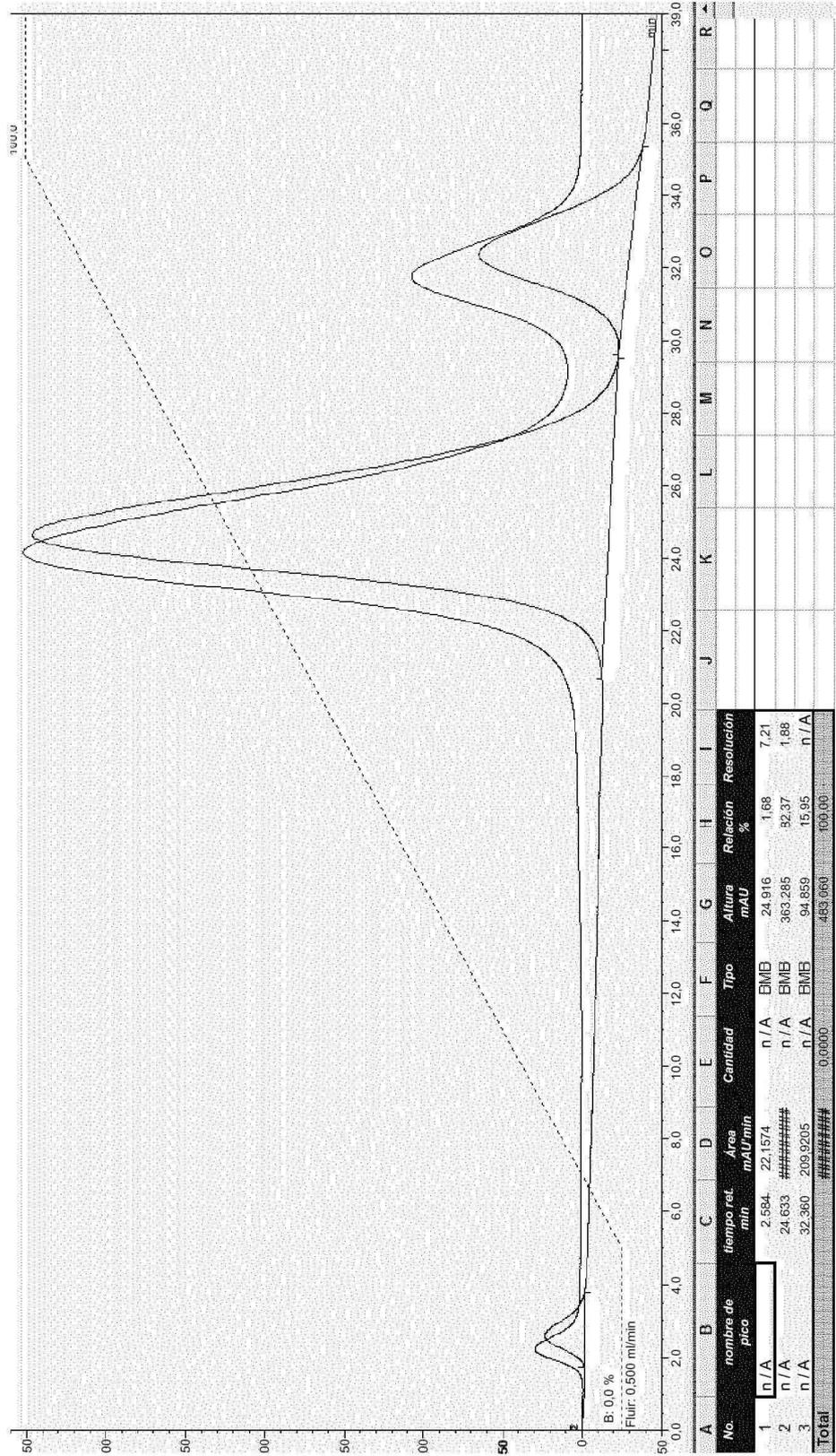


Fig. 6

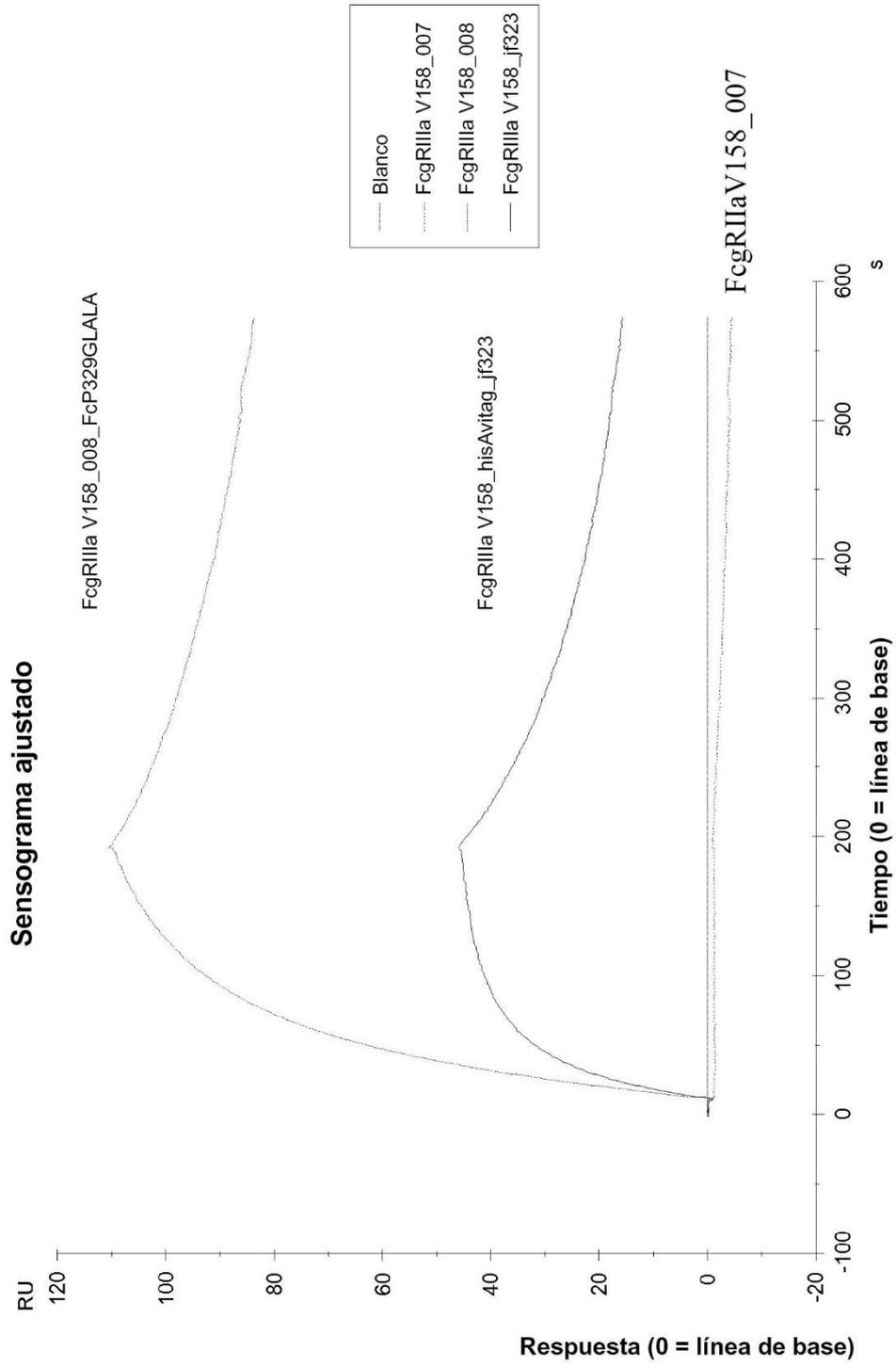
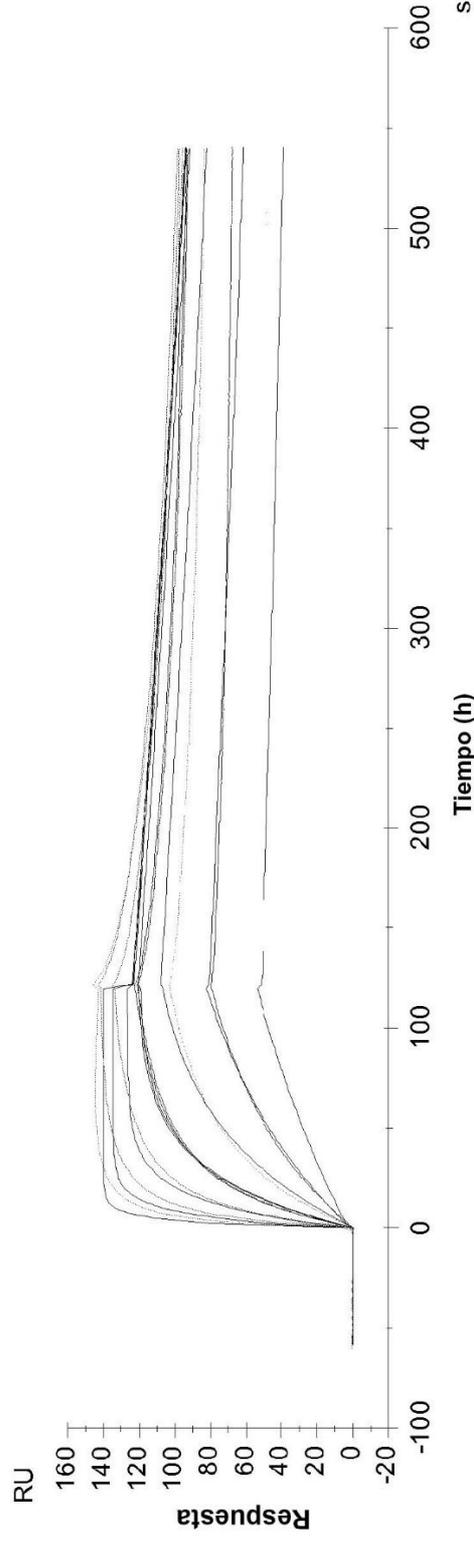


Fig. 7a

FcgRIIIa V158_008



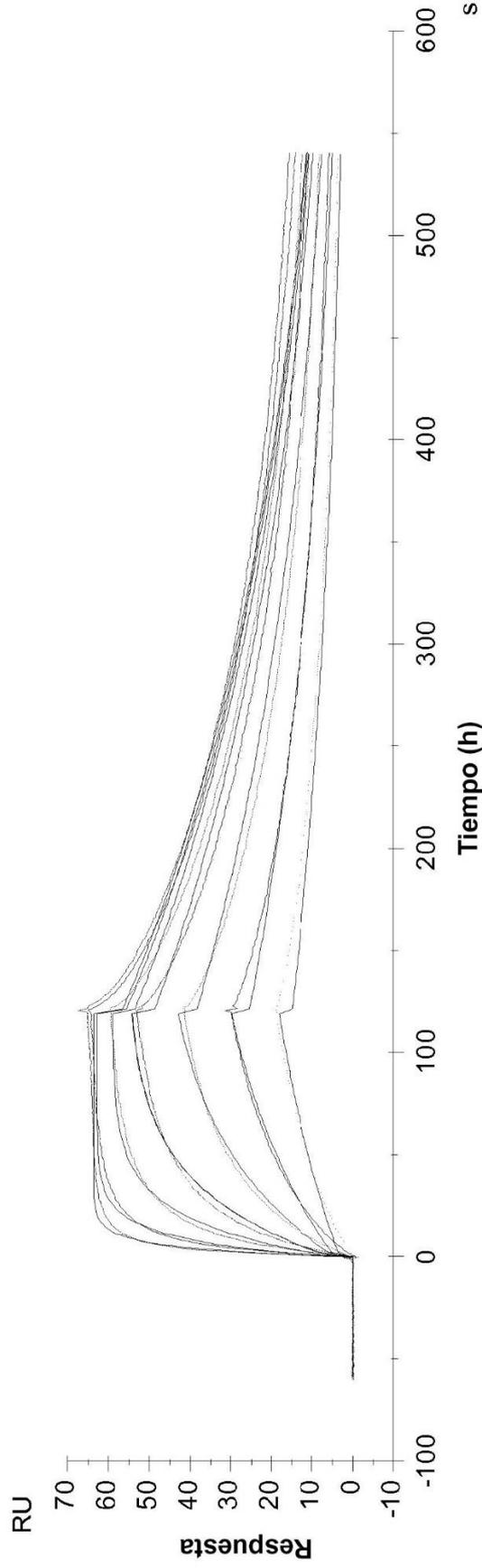
Ka (1 / Ms)
5.961E + 5

Kd (1 / s)
6,535 E - 4

KD (M)
1.096E-9

Fig. 7b

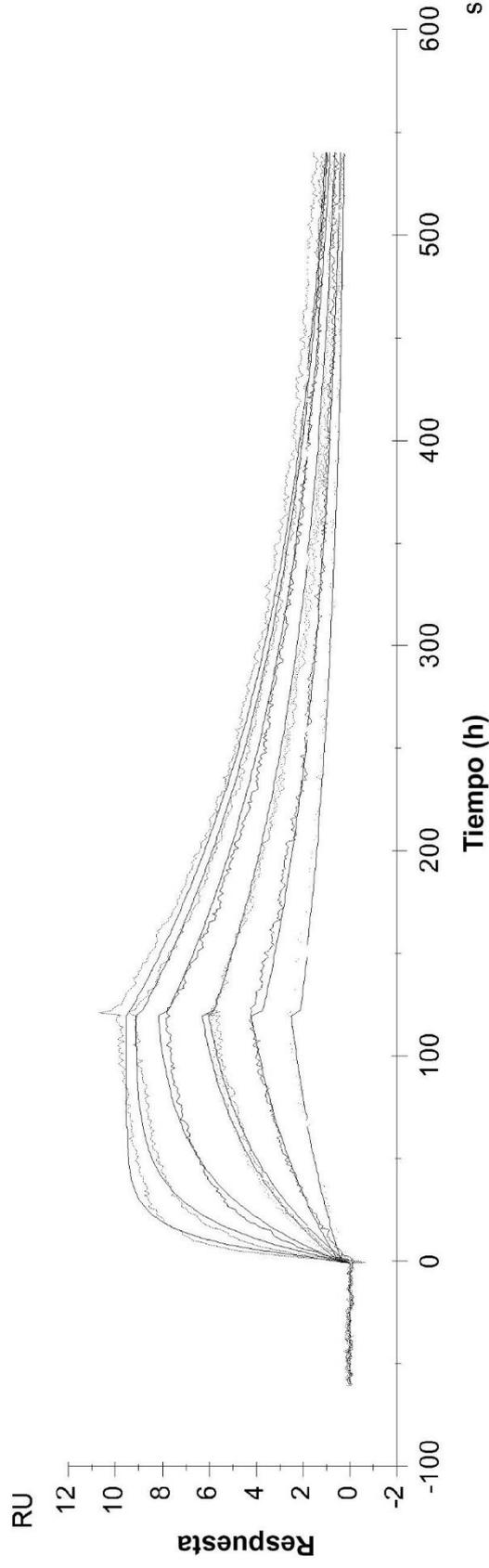
FcgRIIIa V158_jf323



Ka (1 / Ms)	kd (1/s)	KD (M)
4,090E + 5	0.003832	9.369E-9

Fig. 7c

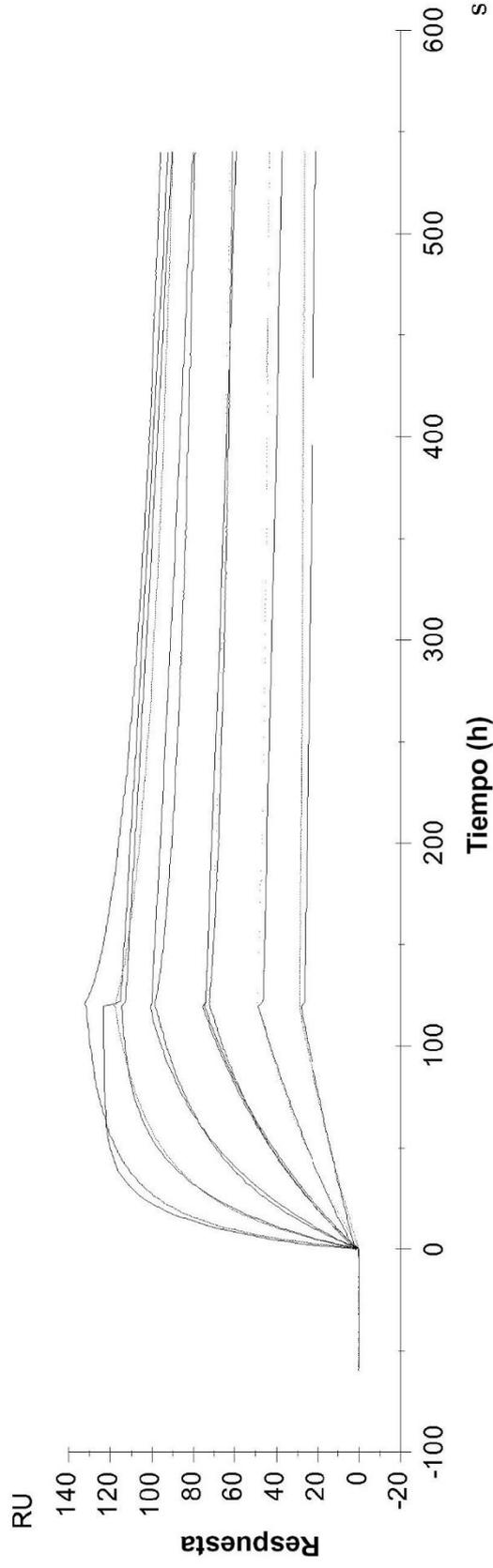
FcgRIIIa V158_008 digerido



Ka (1 / Ms)	kd (1/s)	KD (M)
3,595E + 5	0.005281	1.469E-8

Fig. 7d

FcgRIIIa V158_008 no digerido



Ka (1 / Ms)	Kd (1 / s)	KD (M)
2,846 E + 5	5,276 E - 4	1.854E-9

Fig. 8

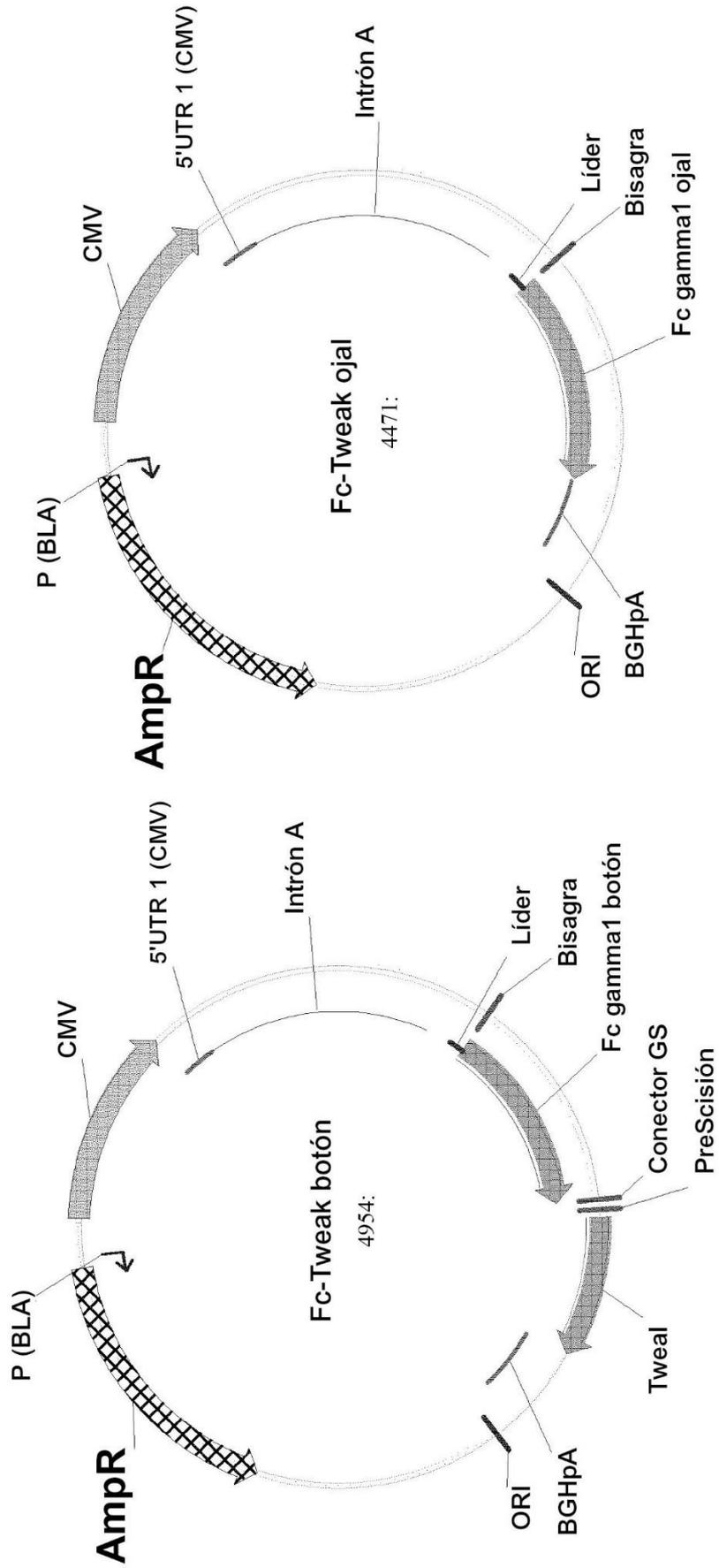


Fig. 9

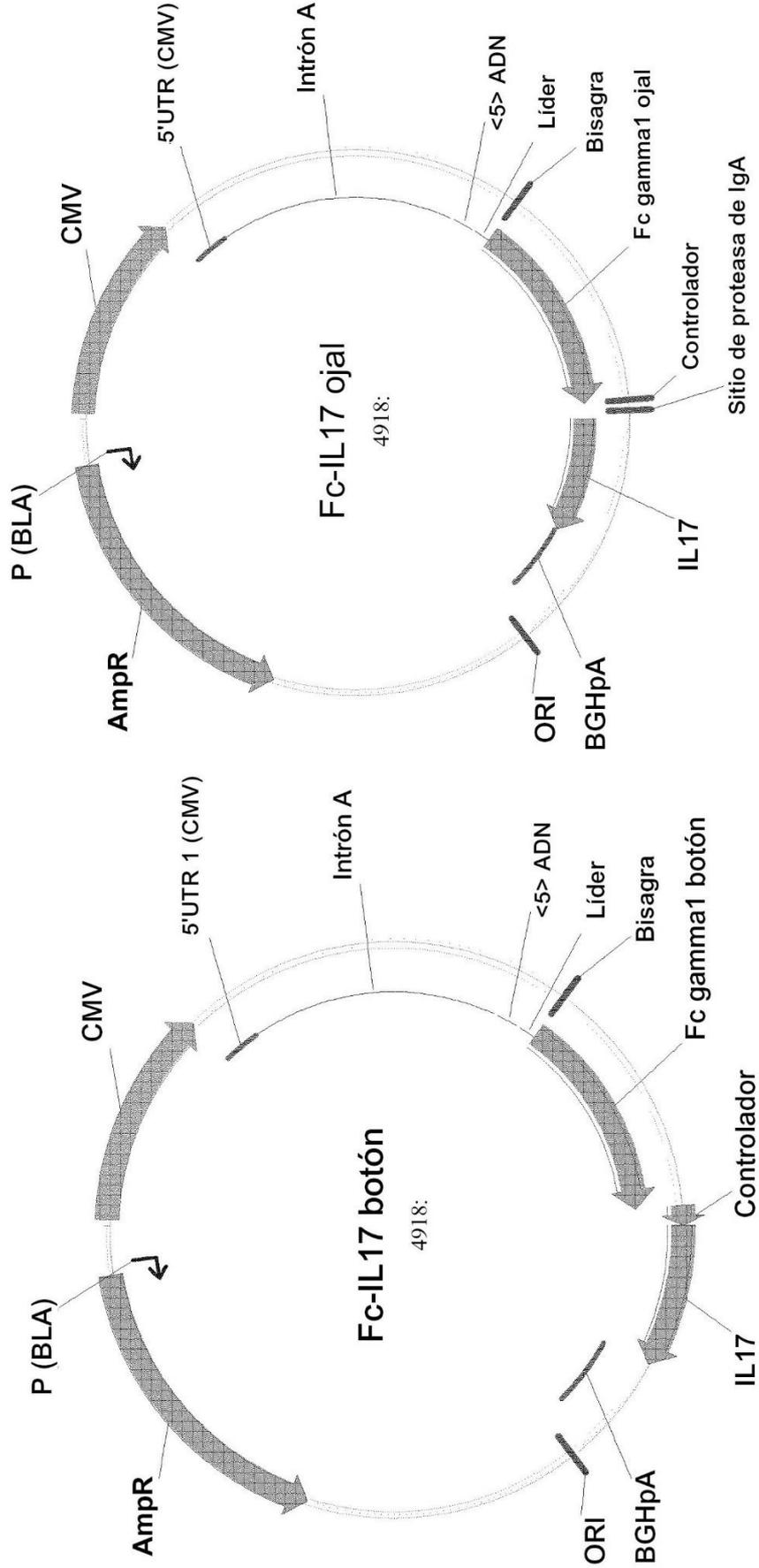
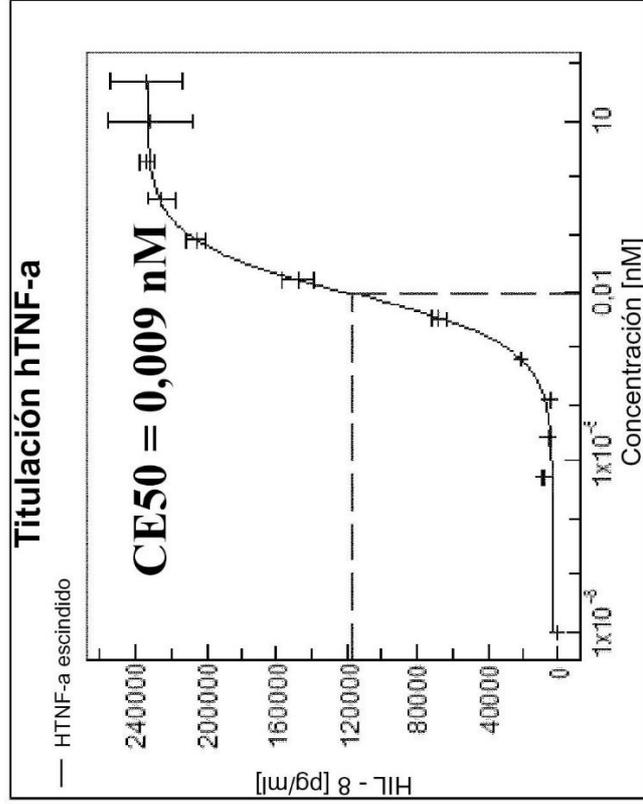


Fig. 10

TNF α (escindido)



TNF α : Fc

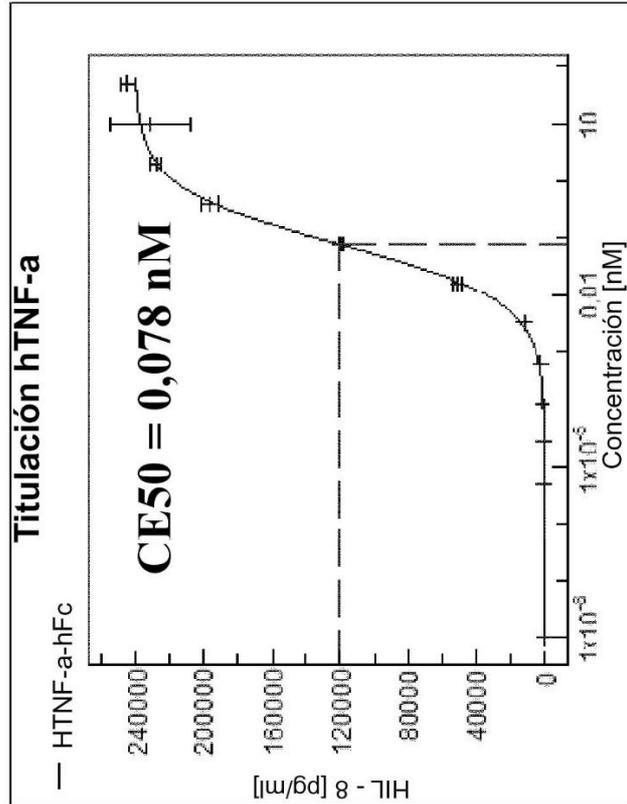
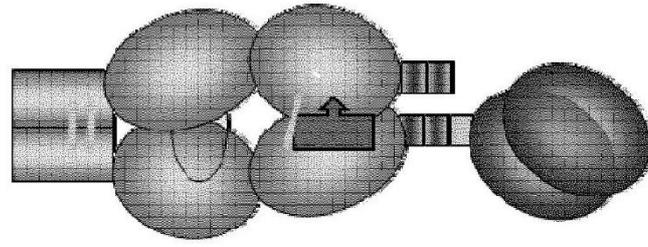
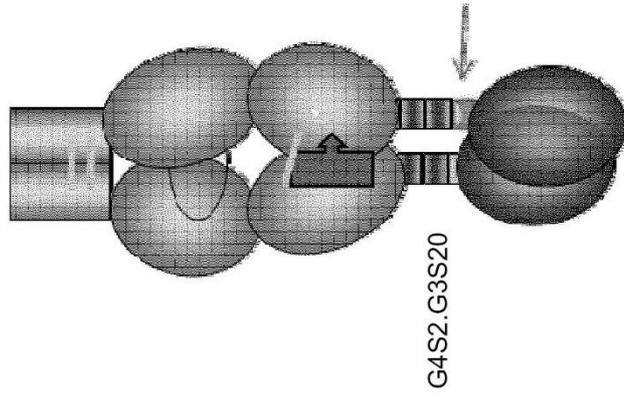


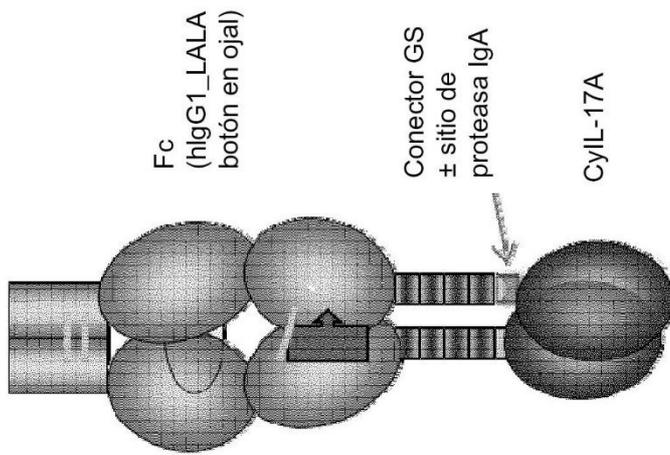
Fig. 11



**Conector corto,
escindido**



Conector corto



Conector largo

Fig. 12

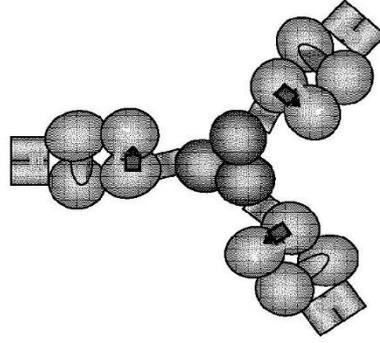
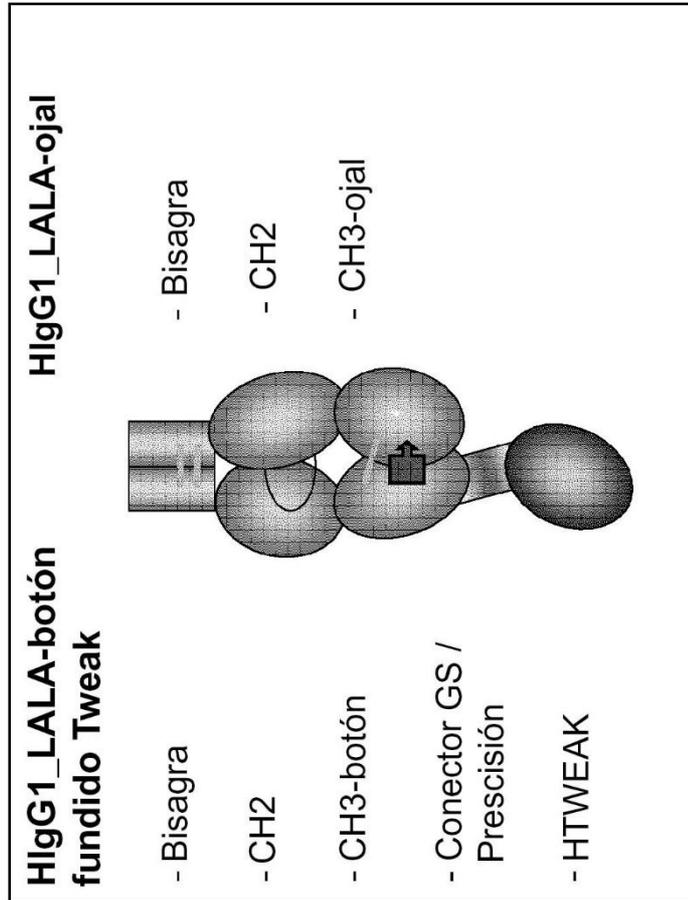


Fig. 13

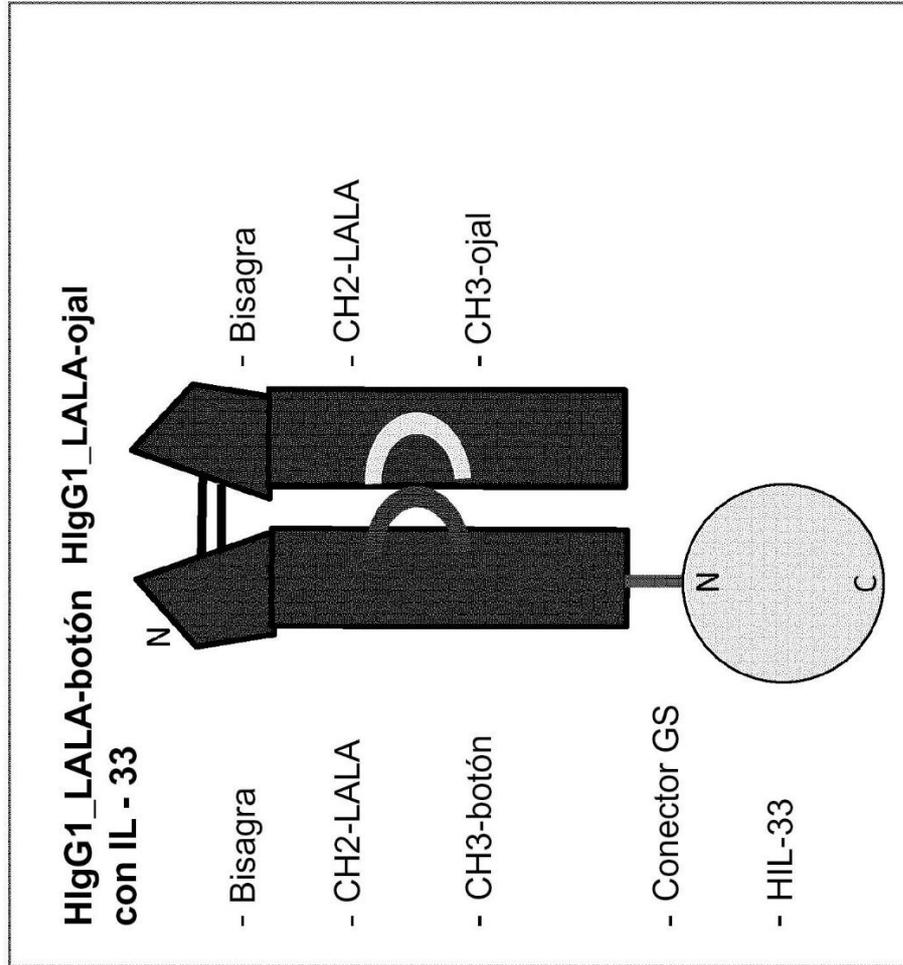


Fig. 14

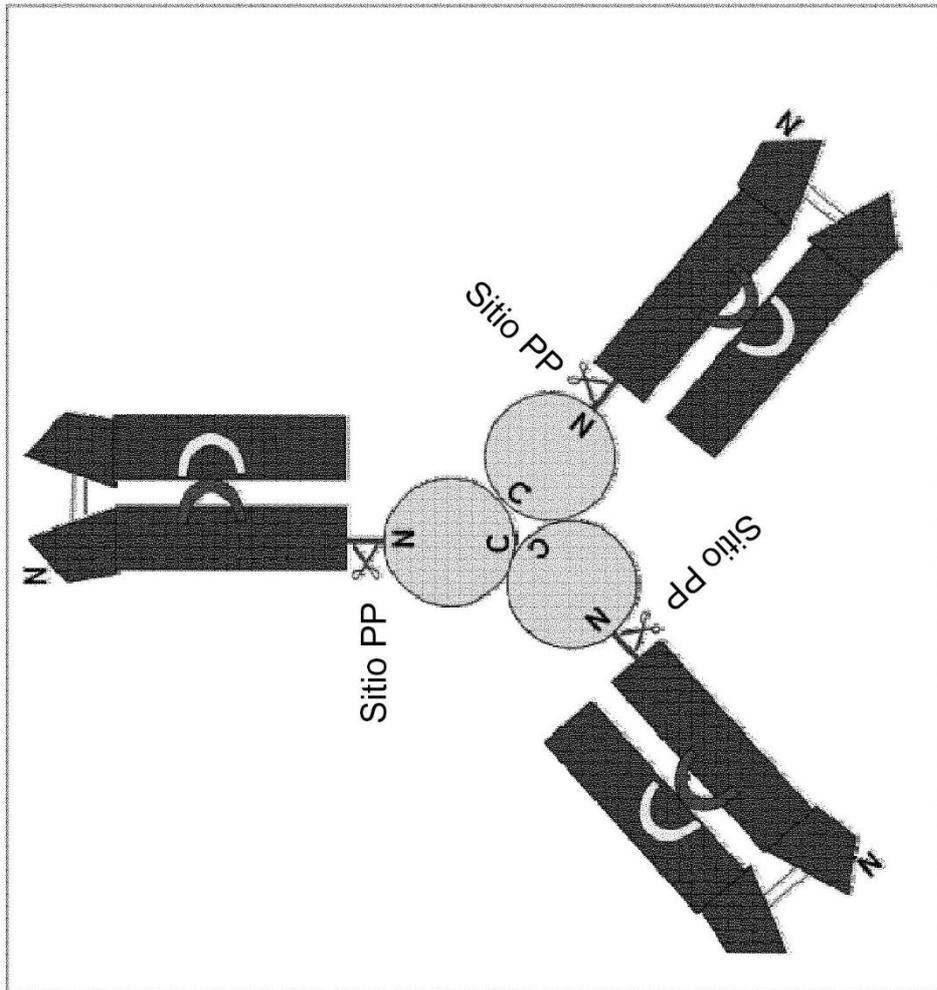


Fig. 15

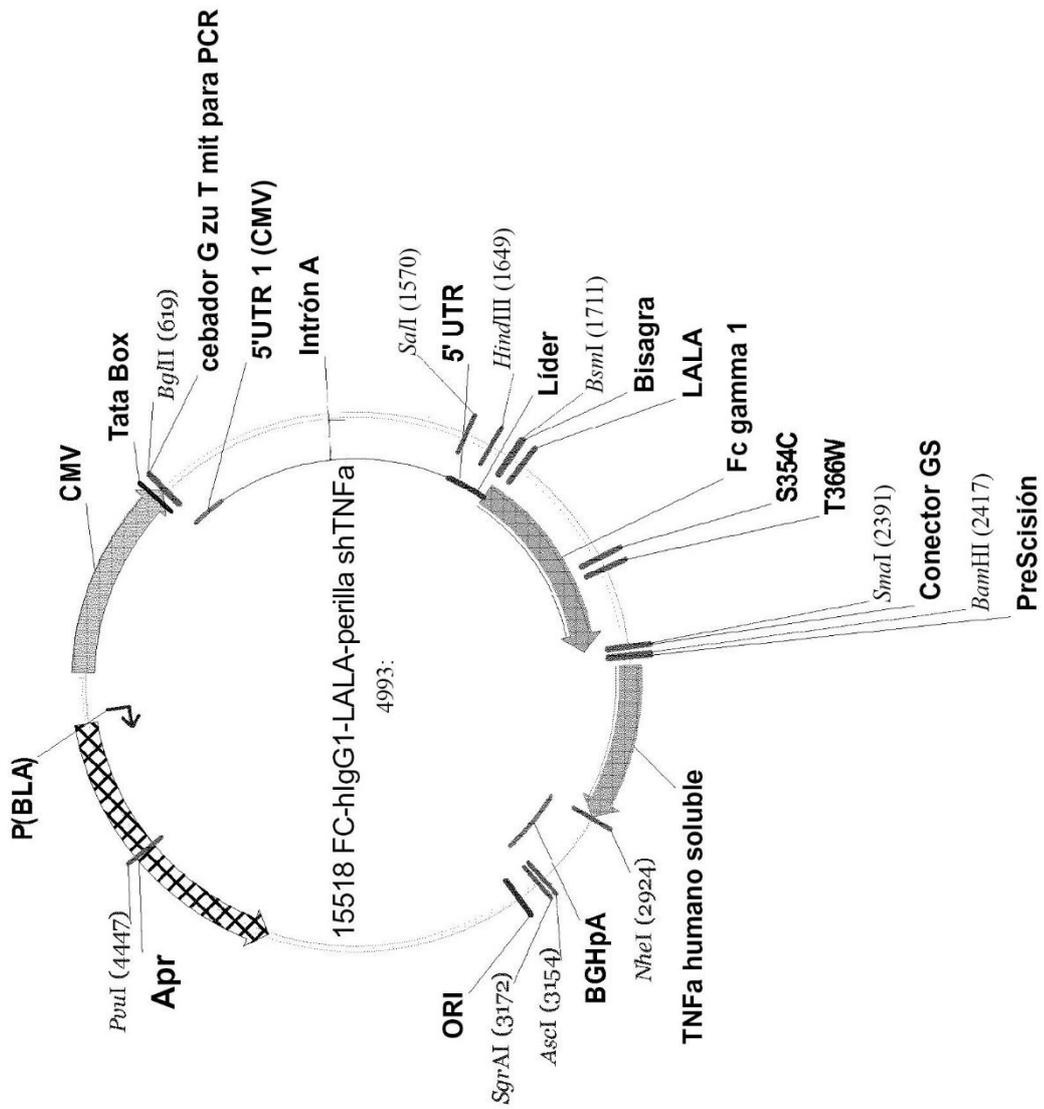


Fig. 16

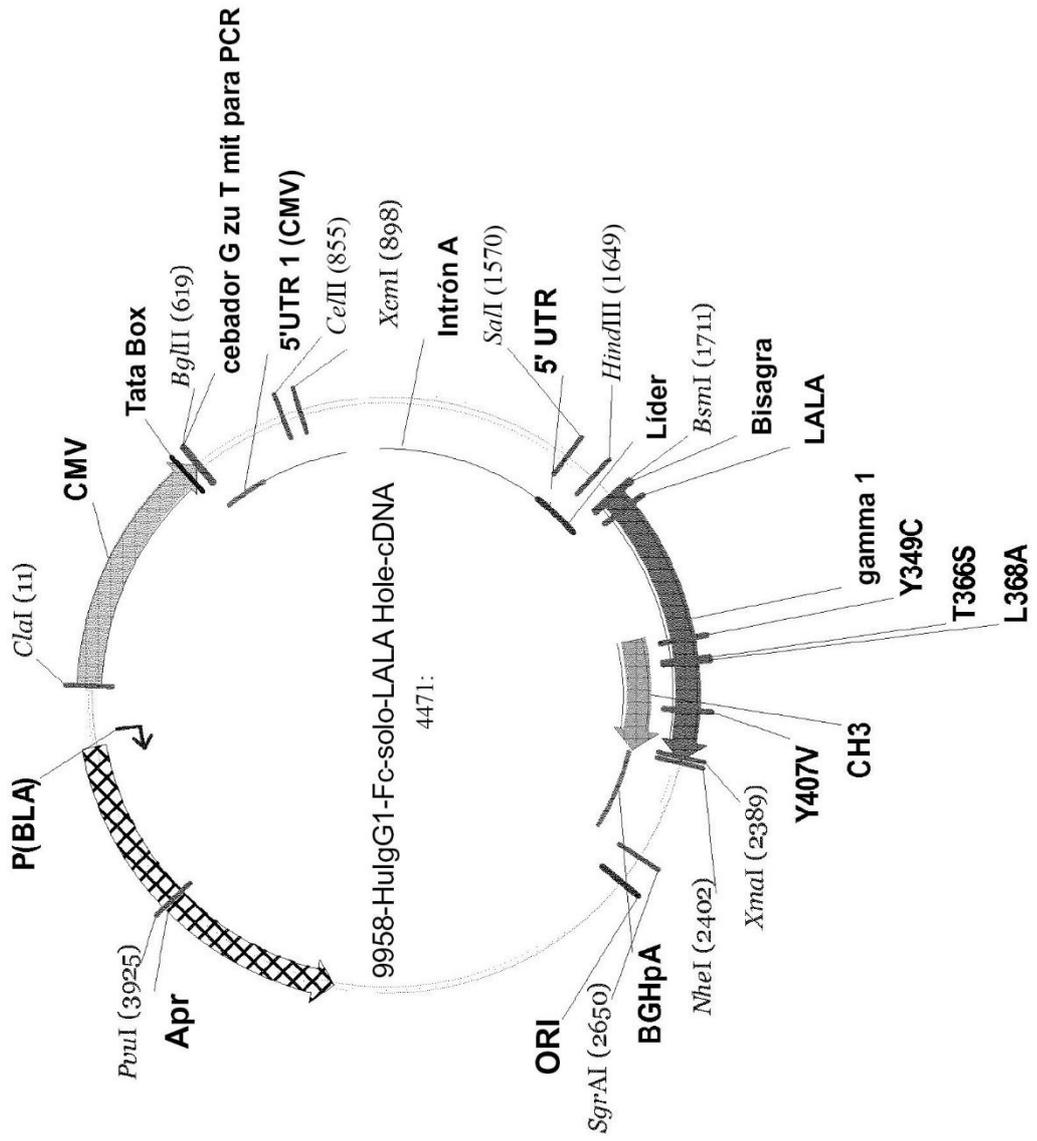


Fig. 17

