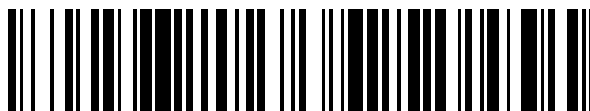


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 784**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2013 PCT/US2013/044551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184938**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 13800676 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2858672**

54 Título: **Polipéptidos de fusión que comprenden ligador de polipéptidos de dominio de mucina**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657264 P

08.06.2012 US 201261657285 P

08.06.2012 US 201261657378 P

06.11.2012 US 201261723081 P

13.03.2013 US 201361778812 P

13.03.2013 US 201361778575 P

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

12.07.2018

73 Titular/es:

ALKERMES, INC. (100.0%)

852 Winter Street

Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

ALVAREZ, JUAN y

MCSWEENEY, LESLIE, A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 675 784 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

Polipéptidos de fusión que comprenden ligador de polipéptidos de dominio de mucina

5 Antecedentes de la invención

La construcción de una proteína de fusión implica la unión de dos proteínas o dominios de proteínas mediante un ligador peptídico. La selección de una secuencia de ligador apropiada es importante, ya que puede afectar la función y propiedades físicas de la proteína de fusión resultante. A menudo, los ligadores flexibles e hidrófilos se eligen para no restringir excesivamente y por lo tanto perturbar las funciones de los dominios. Los ligadores se pueden utilizar para controlar la distancia y la orientación de los dominios. La fusión de una proteína o péptido bioactivo a menudo da como resultado la pérdida de bioactividad, probablemente debido a la interferencia estérica del socio de fusión. Adicionalmente, en el caso de las fusiones de Fc, debido a su naturaleza dimérica, también se puede producir interferencia entre las dos copias de la proteína heteróloga.

15 Las proteínas de mucina y los dominios de mucina de proteínas contienen un alto grado de glucosilación que permite estructuralmente que las proteínas de mucina y otros polipéptidos que comprenden dominios de mucina se comporten como espirales aleatorias rigidizadas. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que esta estructura en espiral aleatoria reforzada en combinación con los carbohidratos hidrofílicos ramificados hidrófilos que constituyen los dominios de mucina fuertemente glucosilados es particularmente útil como un ligador en una proteína de fusión. La naturaleza de tipo varilla de los dominios de mucina puede separar rígidamente la proteína bioactiva del socio de fusión, y por lo tanto ser menos susceptible a la pérdida de actividad. En el caso de fusiones de Fc, la proyección rígida lejos de la Fc dará como resultado una mayor separación entre cada copia de la proteína de interés, permitiendo también que las proteínas de fusión más grandes se expresen como fusiones de Fc. También debido al alto nivel de glucosilación, la adición de un dominio de mucina tiene el potencial de modificar las propiedades fisicoquímicas de una proteína tales como la carga, la solubilidad y las propiedades viscoelásticas de soluciones concentradas de la proteína activa.

30 Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión que tiene bioactividad mejorada que comprende un primer socio de fusión de polipéptido y un segundo socio de fusión de polipéptido, en el que el primer socio de fusión se liga al segundo socio de fusión mediante un ligador de polipéptido de dominio de mucina, en el que la bioactividad de la proteína de fusión se mejora cuando se compara con la fusión del primer socio de fusión de polipéptido y el segundo socio de fusión de polipéptido en la ausencia del ligador del polipéptido del dominio mucina, en el que;

40 a) el ligador de polipéptido de dominio de mucina comprende todo o una porción de una secuencia de polipéptido de dominio de mucina codificada por un gen MUC seleccionado del grupo que consiste de MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC 16, MUC 17, MUC 19, MUC20, y MUC21 o una variante de la secuencia de polipéptidos de dominio de mucina con por lo menos 90% de identidad de secuencia en el nivel de aminoácido;

45 b) el primer socio de fusión se selecciona del grupo que consiste de sTNFR2, CTLA4, TACI, LFA, IL-1RI, IL-1Ra, IL-1RAcP, VEGF receptor, GLP-1, exendin-4 y una secuencia de aminoácidos homóloga a cualquiera de los anteriores con por lo menos 95% de identidad de secuencia en el nivel de aminoácido; y

c) el segundo socio de fusión de polipéptido comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.

50 Se divulgan en este documento proteínas de fusión que tienen bioactividad mejorada que comprenden un primer socio de fusión de polipéptido y un segundo socio de fusión de polipéptido en el que el primer socio de fusión se liga al segundo socio de fusión mediante un ligador del polipéptido del dominio mucina y en el que la bioactividad de la proteína de fusión de la invención se mejora cuando se compara con la fusión del primer socio de fusión de polipéptido y el segundo socio de fusión de polipéptido en la ausencia del ligador del polipéptido del dominio mucina. Los ligadores de polipéptido de dominio de mucina comprenden un dominio de mucina que es rico en sitios potenciales de glucosilación, y tiene un alto contenido de serina y/o treonina y prolina, que pueden representar más de 40% de los aminoácidos dentro del dominio de mucina y comprenden adicionalmente por lo menos aproximadamente 60% de su masa debido a los glicanos. Los ligadores de polipéptido de dominio de mucina pueden comprender unidades de repetición de aminoácido en tándem (también mencionadas en este documento como TR) que puede variar en longitud desde aproximadamente 8 aminoácidos a 150 aminoácidos por cada unidad de repetición en tándem. El ligador de polipéptido de dominio de mucina puede comprender por lo menos una secuencia de repetición en tándem que comprende la SEQ ID NO: 14. El número de unidades de repetición en tándem puede variar entre 1 y 5 en un ligador de polipéptido de dominio de mucina de la invención.

65 Los ligadores de polipéptido de dominio de mucina son capaces de separar de forma rígida el primer y segundo socios de fusión de polipéptido reduciendo de esta manera la posibilidad de que un socio de fusión interferirá con la

- actividad biológica del otro socio de fusión. El alto nivel de glucosilación de los ligadores de polipéptido de mucina proporciona protección contra la proteólisis y potencialmente aumenta la solubilidad de uno o ambos de los socios de fusión. Cuando la proteína de fusión es un ligador de dominio de mucina terapéutico humano se puede derivar de secuencias completamente humanas y el alto nivel de glucosilación también reduce el riesgo de inmunogenicidad en un humano. El grado de separación deseado entre los socios de fusión se puede personalizar para proporcionar la actividad máxima de la proteína de fusión al variar el número de repeticiones en tándem que comprenden el polipéptido del dominio de mucina.
- Por lo menos uno del primer socio de fusión o el segundo socio de fusión es una proteína activa de longitud completa circularmente permutada, un fragmento circularmente permutado de una proteína activa o una variante de secuencia permutada circularmente de una proteína activa, en la que la proteína permutada circularmente, fragmento o variante de secuencia retiene por lo menos una actividad biológica de la proteína activa nativa.
- El primer socio de fusión puede ser IL-1RI o una secuencia de aminoácidos homóloga al mismo con por lo menos 95% de identidad de secuencia en el nivel de aminoácido.
- La proteína de fusión de la invención puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 o una secuencia de aminoácidos homóloga al mismo con por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia. La proteína de fusión de la invención puede tener la secuencia de aminoácidos de residuos 24-452 de la SEQ ID NO.2.
- La bioactividad mejorada de la proteína de fusión puede ser vida media aumentada.
- Se puede utilizar un ligador de polipéptido de dominio de mucina solo o en combinación con una secuencia de ligadores flexible adicionales, y también puede comprender una etiqueta para purificación. El ligador de polipéptido de dominio de mucina también puede impartir propiedades mejoradas (por ejemplo propiedades farmacocinéticas y/o fisicoquímicas) sobre la proteína de fusión comparación con la proteína de fusión que no comprende un ligador de polipéptido de dominio de mucina.
- También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y métodos para elaborar los polipéptidos métodos para elaborar los polipéptidos. Por lo tanto, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión del primer aspecto.
- En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión del primer aspecto, opcionalmente que comprende adicionalmente una secuencia reguladora recombinante ligada operablemente a la secuencia de polinucleótidos.
- En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula anfitriona que comprende el vector de expresión del tercer aspecto. Las proteínas de fusión de esta invención se puede elaborar al transformar células anfitrionas con ácido nucleico que codifica la fusión, cultivar la célula anfitriona y recuperar la fusión del cultivo, o alternativamente al generar una construcción de ácido nucleico que codifica la fusión y producir el polipéptido mediante síntesis libre de células, cuya síntesis puede incluir reacciones de transcripción y traducción acopladas.
- En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la bioactividad de una proteína de fusión que comprende un primer socio de fusión de polipéptido y un segundo socio de fusión de polipéptido, el método comprende las etapas de:
- a) proporcionar un primer socio de fusión de polipéptido, un segundo socio de fusión de polipéptido y un ligador de polipéptido de dominio de mucina;
 - b) ligar el primer socio de fusión de polipéptido al segundo socio de fusión de polipéptido mediante el ligador de polipéptido de dominio de mucina para formar una proteína de fusión que comprende un primer socio de fusión de polipéptido y un segundo socio de fusión de polipéptido en el que el primer socio de fusión se liga al segundo socio de fusión mediante un ligador de polipéptido de dominio de mucina;
 - c) medir por lo menos una medida de bioactividad de la proteína de fusión de la etapa (b) con una proteína de fusión que comprende el primer socio de fusión de polipéptido y el segundo socio de fusión de polipéptido en la ausencia del ligador de polipéptido de dominio de mucina; y
 - d) determinar que la bioactividad medida de la proteína de fusión de la etapa (b) se mejora cuando se compara con la fusión del primer socio de fusión de polipéptido y el segundo socio de fusión de polipéptido en la ausencia del ligador de polipéptido de dominio de mucina; en el que la proteína de fusión creada en la etapa b) comprende la proteína de fusión del primer aspecto.
- Las proteínas de fusión se pueden purificar y formular en vehículos farmacológicamente aceptables para administración a un paciente.

Por lo tanto, en un sexto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión del primer aspecto y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 También se proporciona la composición farmacéutica del sexto aspecto para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno o afección.

10 La enfermedad o trastorno o afección se puede seleccionar de: diabetes tipo 2, hemofilia, neutropenia, anemia, trombocitopenia, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, osteoartritis; y/o la composición farmacéutica se puede administrar por vía subcutánea, vía intramuscular o vía intravenosa.

Dichas proteínas de fusión encuentran uso como reactivos inmunológicamente específicos; por ejemplo, para aumentar la vida media en plasma de un polipéptido de interés o para dirigir la proteína a un tipo de célula particular.

15 Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1: Construcciones base y construcciones que contienen un ligador de mucina. RDB1800 es una proteína de fusión IL-1Ra_Fc, RDB1819 análoga a RDB1800 pero contiene una secuencia de mucinas intermedia entre los dominios IL-1Ra y Fc. De manera similar, RDB1601 es una proteína de fusión gp130(D1-D3)_Fc, con los dominios D1 a D3 de gp130 directamente ligados a un dominio IgG1 Fc, y RDB1613 contiene una secuencia de mucinas entre gp130 (D1-D3) y los dominios Fc.

25 Figura 2: Inhibición de la señalización de IL1 β por IL-1Ra (●), RDB1800 (■) y RDB1819 (▲) en el ensayo de células HEK-blue™. Los valores estimados de IC₅₀ se reportan en la esquina superior derecha de la figura.

Figura 3: Cromatograma de filtración en gel de RDB1800 (gris claro) y RDB1819 (discontinuo, gris oscuro) y estándares de tamaño molecular (sólido, gris oscuro). Los pesos moleculares de los estándares se enumeran anteriormente de sus picos de elución.

30 Figura 4: Los efectos inhibidores de una sola inyección de 20 mg/kg de RDB1800 y RDB1819 en el modelo de inflamación CAIA de ratón. Las flechas negras indican los días de inyección con el cóctel de anticuerpos monoclonales (mAb) y con LPS y molécula de tratamiento. El % de reducción en el edema de la pata se calculó para cada compuesto en comparación con el control de la solución salina. Se utilizó un grupo de diez ratones para cada tratamiento.

35 Figura 5: Inhibición de la diferenciación mediada por IL-6 de células M1 RDB1601 (●) y RDB1613 (▲). Los valores estimados de IC₅₀ se reportan en la tabla.

40 Figura 6: Inhibición de la diferenciación mediada por IL-6 de células M1 por RDB1542 y RDB1562.

Figura 7: Señalización dependiente de IL-1 β en células IL-1 β HEK-Blue™ por RDB1840 y RDB1841

Descripción detallada de la invención

45 Sigue una descripción de las realizaciones preferidas de la invención.

Definiciones

50 Como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario.

55 Como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas.

60 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de forma intercambiable en este documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y se puede interrumpir por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado, por ejemplo, mediante formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como la conjugación con un componente de marcado.

65 Como se utiliza en este documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen, pero no se limitan a, glicina y ambos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Los códigos estándar de una o tres letras se utilizan para designar aminoácidos.

El término "de origen no natural", como se aplica a las secuencias y como se utiliza en el presente documento, significa secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas que no tienen un equivalente, no son complementarias, o no tienen un alto grado de homología con una secuencia de tipo natural o de origen natural que se encuentra en un mamífero. Por ejemplo, un polipéptido de origen no natural puede compartir no más del 99%, 98%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% o incluso menos identidad de secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia natural cuando se alinee de forma adecuada.

Los términos "glucosilación" y "glucosilada" se utilizan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a la porción de carbohidrato de una proteína o al proceso mediante el cual los azúcares se unen postraduccionalmente a proteínas durante su producción en células para formar glucoproteínas. La glucosilación de proteínas ligadas a O es un evento postraducciona y se refiere a la unión de glicanos a serina y treonina y, en menor medida, a hidroxiprolina e hidroxilisina.

Un "fragmento" es una forma troncada de una proteína activa nativa que retiene por lo menos una porción de la actividad terapéutica y/o biológica. Una "variante" es una proteína con homología de secuencia con la proteína activa nativa que retiene por lo menos una porción de la actividad terapéutica y/o biológica de la proteína activa. Por ejemplo, una proteína variante puede compartir por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína activa de referencia. Como se utiliza en el presente documento, el término "fracción de proteína activa" incluye proteínas modificadas deliberadamente, como por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, inserciones, o accidentalmente a través de mutaciones.

Una "célula anfitriona" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para los vectores del sujeto. Las células anfitrionas incluyen la progenie de una única célula anfitriona. La progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en genómica del complemento de ADN total) a la célula pariente original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula anfitriona incluye células transfectadas in vivo con un vector de esta invención.

"Aislado", cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos divulgados en el presente documento, significa polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Como es evidente para aquellos expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos del mismo de origen no natural no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su equivalente natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo, "concentrado", "separado" o "diluido", o fragmentos del mismo, se distinguen de su equivalente natural en que la concentración o el número de moléculas por volumen es generalmente mayor que aquel de su equivalente de origen natural. En general, un polipéptido producido por medios recombinantes y expresado en una célula anfitriona se considera "aislado".

Un ácido nucleico que codifica un polinucleótido o polipéptido "aislado" u otro ácido nucleico que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado es distinta de la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos aislados se distinguen de la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido específico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado incluye moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos contenidos en células que ordinariamente expresan el polipéptido en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica o extracromosómica diferente de aquella de las células naturales.

"Conjugado", "ligado", "fusionado" y "fusión" se utilizan de forma intercambiable en este documento. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes químicos, por cualquier medio que incluye conjugación química o medios recombinantes. Por ejemplo, un promotor o potenciador se liga operativamente a una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia. Generalmente, "operativamente unida" significa que las secuencias de ADN que se ligan son contiguas, y en fase de lectura o en marco. Una "fusión en el marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) para formar un ORF continuo más largo, de una manera que mantiene el marco de lectura correcto de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una sola proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos normalmente no están tan unidos en la naturaleza).

En el contexto de polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección terminal amino a carboxilo en la que los residuos que se encuentran próximos en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido. Una "secuencia parcial" es una secuencia lineal de parte de un polipéptido que se sabe que comprende residuos adicionales en una o ambas direcciones.

"Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, una secuencia rica en glicina eliminada de su secuencia codificante nativa y unida

operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es una secuencia heteróloga rica en glicina. El término "heterólogo" como se aplica a un polinucleótido, un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva de una entidad genotípicamente distinta de aquella del resto de la entidad con la que se compara.

5 Los términos "polinucleótidos", "ácidos nucleicos", "nucleótidos" y "oligonucleótidos" se utilizan de forma intercambiable. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos
10 no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definido a partir del análisis de ligamiento, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si está presente, pueden impartirse modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del
15 ensamble del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un

"Recombinante" como se aplica a un polinucleótido significa que el polinucleótido es el producto de varias combinaciones de clonación in vitro, etapas de restricción y/o ligación, y otros procedimientos que dan como resultado una construcción que se puede expresar potencialmente en una célula anfitriona.

Los términos "gen" o "fragmento de gen" se utilizan de forma intercambiable en este documento. Se refieren a un polinucleótido que contiene por lo menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar una proteína particular después de transcribirse y traducirse. Un gen o fragmento de gen puede ser genómico o de ADNc, siempre que el polinucleótido contenga por lo menos un marco de lectura abierto, que puede cubrir toda la región de codificación o un segmento de la misma. Un "gen de fusión" es un gen compuesto mediante por lo menos dos polinucleótidos heterólogos que están unidos entre sí.

"Homología" u "homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o intercambiabilidad entre dos o más secuencias de polinucleótidos o dos o más secuencias de polipéptidos. Cuando se utiliza un programa como BestFit para determinar la identidad, similitud u homología de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos diferentes, se pueden utilizar las configuraciones predeterminadas, o se puede seleccionar una matriz de puntuación apropiada, tal como blosum45 o blosum80, para optimizar los puntajes de identidad, similitud u homología. Preferiblemente, los polinucleótidos que son homólogos son aquellos que se hibridan bajo condiciones rigurosas como se define en este documento y tienen por lo menos 70%, preferiblemente por lo menos 80%, más preferiblemente por lo menos 90%, más preferiblemente 95%, más preferiblemente 97%, más preferiblemente 98%, e incluso más preferiblemente el 99% de identidad de secuencia con aquellas secuencias.

Los términos "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" incluyen referencias a condiciones bajo las cuales un polinucleótido se hibridará con su secuencia objetivo, en un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, por lo menos 2 veces sobre el antecedente). Generalmente, la rigurosidad de la hibridación se expresa, en parte, con referencia a la temperatura y la concentración de sal bajo la cual se lleva a cabo la etapa de lavado. Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente ión de Na 1.5 M, normalmente aproximadamente concentración de iones Na de 0.01 a 1.0 M (u otras sales) a pH 7.0 a 8.3 y la temperatura es de por lo menos aproximadamente 30 °C para polinucleótidos cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos aproximadamente 60 °C para polinucleótidos largos (por ejemplo, más de 50 nucleótidos), por ejemplo, las "condiciones rigurosas" pueden incluir hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37 °C, y tres lavados durante 15 minutos cada uno en 0.1 X SSC/SDS al 1% a 60 a 65 °C. Alternativamente, se pueden utilizar temperaturas de aproximadamente 65 °C, 60 °C, 55 °C o 42 °C. La concentración de SSC puede variar desde aproximadamente 0.1 a 2XSSC, estando presente SDS a aproximadamente 0.1%. Dichas temperaturas de lavado normalmente se seleccionan para que estén aproximadamente 5 °C. a 20 °C por debajo del punto de fusión térmico para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia objetivo se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. Una ecuación para calcular la T_m y las condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos es bien conocida y se puede encontrar en Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.; específicamente, véase el Volumen 2 y Capítulo 9. Normalmente, los reactivos de bloqueo se utilizan para bloquear la hibridación no específica. Dichos reactivos de bloqueo incluyen, por ejemplo, ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado a aproximadamente 100-200 µg/ml. El solvente orgánico, tal como formamida a una concentración de aproximadamente 35-50% v/v, también se puede utilizar bajo circunstancias particulares, tal como para hibridaciones de ARN: ADN. Las variaciones útiles sobre estas condiciones de lavado serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

Los términos "porcentaje de identidad" y "% de identidad", como se aplican a secuencias de polinucleótidos, se refieren al porcentaje de coincidencias de residuos entre por lo menos dos secuencias de polinucleótidos alineadas

utilizando un algoritmo estandarizado. Dicho algoritmo se puede insertar, de forma estandarizada y reproducible, los huecos en las secuencias que se están comparando para optimizar la alineación entre dos secuencias y, por lo tanto, lograr una comparación más significativa de las dos secuencias. El porcentaje de identidad se puede medir a lo largo de una secuencia de polinucleótidos definida completa, por ejemplo, como se define mediante un número de SEQ ID particular, o se puede medir en una longitud más corta, por ejemplo, sobre la longitud de un fragmento tomado de una secuencia de polinucleótidos definida más grande, por ejemplo, un fragmento de por lo menos 45, por lo menos 60, por lo menos 90, por lo menos 120, por lo menos 150, por lo menos 210 o por lo menos 450 residuos contiguos. Dichas longitudes son solo a modo de ejemplo, y se entiende que cualquier longitud de fragmento soportada por las secuencias mostradas en este documento, en las Tablas, Figuras o Listado de Secuencias, se puede utilizar para describir una longitud sobre la que se puede medir el porcentaje de identidad.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos", con respecto a las secuencias de polipéptidos identificadas en el presente documento, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia de consulta que son idénticos a los residuos de aminoácidos de una segunda secuencia de polipéptidos de referencia o una porción de la misma, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando software de computadora disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, que incluyen los algoritmos necesarios para lograr una alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. El porcentaje de identidad se puede medir a lo largo de una secuencia de polipéptidos definida completa, por ejemplo, como se define mediante un número de SEQ ID particular, o se puede medir en una longitud más corta, por ejemplo, a lo largo de un fragmento tomado de una secuencia de polipéptidos definida, más grande, por ejemplo, un fragmento de por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 70 o por lo menos 150 residuos contiguos. Dichas longitudes son solo a modo de ejemplo, y se entiende que cualquier longitud de fragmento soportada por las secuencias mostradas en este documento, en las Tablas, Figuras o Listado de Secuencias, se puede utilizar para describir una longitud sobre la que se puede medir el porcentaje de identidad.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, preferiblemente autorreplicante en un anfitrión apropiado, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células anfitrionas. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula, la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula anfitriona apropiada, se puede transcribir y traducir en un polipéptido. Un "sistema de expresión" normalmente connota una célula anfitriona adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

"Resistencia a la degradación", tal como se aplica a un polipéptido, se refiere a la capacidad de los polipéptidos para resistir la degradación en sangre o componentes de la misma, que normalmente implica proteasas en el suero o plasma, o dentro de una formulación destinada a almacenamiento o vehículo de suministro para una proteína. La resistencia a la degradación se puede medir al combinar la proteína con sangre, suero, plasma o una formulación humana (o ratón, rata, mono, según corresponda), normalmente durante un rango de días (por ejemplo, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 días), a temperaturas específicas tales como -80 °C, -20 °C, 0 °C, 4 °C, 25 °C y 37 °C. La proteína intacta en las muestras se mide utilizando técnicas estándar de cuantificación de proteínas. El punto de tiempo en el que se degrada el 50% de la proteína es la "vida media de degradación" de la proteína.

El término "vida media" se refiere normalmente al tiempo requerido para que la concentración en plasma de un fármaco se reduzca a la mitad. Los términos "vida media", " $t_{1/2}$ ", "vida media de eliminación" y "vida media circulante" se utilizan de forma intercambiable en este documento.

"Peso molecular aparente" es un término que se refiere a una medida del aumento o disminución relativa del peso molecular aparente exhibido por una secuencia de aminoácidos particular. El peso molecular aparente se determina utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y métodos similares en comparación con los estándares de proteínas globulares y se mide en unidades "kD aparentes".

El "radio hidrodinámico" es el radio aparente (R_h en nm) de una molécula en una solución calculada a partir de propiedades difusionales. El "radio hidrodinámico" de una proteína afecta su velocidad de difusión en solución acuosa así como su capacidad para migrar en geles de macromoléculas. El radio hidrodinámico de una proteína está influenciado por su peso molecular así como por su estructura, que incluye forma y compatibilidad, y su estado de hidratación. Los métodos para determinar el radio hidrodinámico son bien conocidos en la técnica, tal como mediante el uso de DLS y cromatografía de exclusión por tamaño. La mayoría de las proteínas tienen estructura globular, que es la estructura tridimensional más compacta que una proteína puede tener con el radio hidrodinámico más pequeño. Algunas proteínas adoptan una conformación aleatoria y abierta, no estructurada o "lineal" y como

resultado tienen un radio hidrodinámico mucho mayor en comparación con las proteínas globulares típicas de peso molecular similar.

Las "condiciones fisiológicas" se refieren a un conjunto de condiciones en un anfitrión vivo así como en condiciones in vitro, que incluyen temperatura, concentración de sal, pH, que imitan esas condiciones de un sujeto vivo. Se ha establecido un anfitrión de condiciones fisiológicamente relevantes para su uso en ensayos in vitro. Generalmente, un tampón fisiológico contiene una concentración fisiológica de sal y se ajusta a un pH neutro que varía de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7.8, y preferiblemente de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 7.5. Una variedad de tampones fisiológicos se enumera en Sambrook et al. (1989). La temperatura fisiológicamente relevante varía desde aproximadamente 25 °C. a aproximadamente 38 °C, y preferiblemente desde aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C.

"Agente de liberación controlada", "agente de liberación lenta", "formulación de depósito" o "agente de liberación sostenida" se utilizan de forma intercambiable para referirse a un agente capaz de extender la duración de la liberación de un polipéptido de la invención en relación con la duración de liberación cuando el polipéptido se administra en ausencia de agente.

El término "antagonista", como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en este documento. Los métodos para identificar antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido nativo con una molécula antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido nativo. En el contexto de la presente invención, los antagonistas pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, anticuerpos o cualquier otra molécula que disminuya el efecto de una proteína activa.

El término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en este documento. Las moléculas agonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas nativas, etc. Los métodos para identificar agonistas de un polipéptido nativo pueden comprender poner en contacto un polipéptido nativo con una molécula agonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido nativo.

"Actividad" para los propósitos del presente documento se refiere a una acción o efecto de un componente de una proteína de fusión compatible con aquella de la proteína activa nativa correspondiente, en la que la "actividad biológica" o "bioactividad" según se utilizan estos términos de forma intercambiable se refiere aquí a una función o efecto biológico in vitro o in vivo, que incluye, pero no se limita a, unión a receptor, actividad antagonista, actividad agonista o una respuesta celular o fisiológica.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" o "aliviar" o "mejorar" se utilizan de forma intercambiable en el presente documento. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que incluyen, pero no se limitan a, un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o la mejora del trastorno subyacente que se está tratando. También, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de tal manera que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto todavía puede estar afectado por el trastorno subyacente. Para beneficio profiláctico, las composiciones se pueden administrar a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que reporta uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad.

Un "efecto terapéutico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un efecto fisiológico, que incluye pero no se limita a la cura, mitigación, mejora o prevención de enfermedades en humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de humanos o animales, provocado por una proteína de fusión de la invención distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por la proteína activa. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en este documento.

Los términos "cantidad terapéuticamente efectiva" y "dosis terapéuticamente efectiva", como se utilizan en el presente documento, se refieren a una cantidad de una proteína activa, ya sea solo o como parte de una composición de proteína de fusión, que es capaz de tener cualquier cantidad detectable, efecto beneficioso sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o características de un estado de enfermedad o afección cuando se administra en una o dosis únicas repetidas a un sujeto. Dicho efecto no necesita ser absoluto para ser beneficioso.

El término "régimen de dosificación terapéuticamente efectivo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un programa para dosis administradas consecutivamente de una proteína activa, solo o como parte de una composición de proteína de fusión, en la que las dosis se administran en cantidades terapéuticamente efectivas para

dar como resultado un efecto beneficioso sostenido sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o características de un estado de enfermedad o afección.

Proteínas de Fusión

Se divulgan en el presente documento las proteínas de fusión que comprenden un primer socio de fusión de polipéptido unido a un segundo socio de fusión de polipéptido por un ligador de polipéptido de dominio de mucina. Como se utiliza en este documento, los términos "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" o equivalentes gramaticales del presente documento significan una proteína compuesta de una pluralidad de componentes de proteína, que normalmente no están unidos en su estado nativo pero están unidos por sus respectivos terminales amino y carboxilo a través de un ligador de polipéptidos de dominio de mucina de la invención. "Proteína" en este contexto incluye proteínas, polipéptidos y péptidos. La pluralidad en este contexto significa por lo menos dos, y las realizaciones preferidas generalmente utilizan un primer y un segundo socio de fusión de polipéptidos unidos a través de un ligador de polipéptido de dominio de mucina de acuerdo con la invención.

Por lo menos uno o ambos del primer y segundo socios de fusión de polipéptidos son proteínas activas y/o proteínas terapéuticas activas según se define dicho término en este documento. De acuerdo con la invención, la actividad terapéutica/biológica de por lo menos uno de los socios de fusión de polipéptidos mejora cuando se une al otro socio de fusión a través de un ligador de polipéptidos de dominio de mucina de acuerdo con la invención en comparación con los mismos socios de fusión de polipéptidos no ligados a través de un ligador de polipéptidos de dominio de mucina de acuerdo con la invención.

Las proteínas de mucina y los dominios de mucina de proteínas contienen un alto grado de glucosilación que permite estructuralmente que las proteínas de mucina y otros polipéptidos que comprenden dominios de mucina se comporten como espirales aleatorios rigidizados. Como tales, los dominios de mucina están presentes en una variedad de moléculas y receptores de adhesión anclados a la membrana (que incluyen, pero no se limitan a, receptor de LDL, CD164, endosialina, fractalquina, las selectinas, TIM (mucina Ig de transmembrana), en la que su función es para extender el dominio "activo" lejos de la superficie de la célula para una interacción óptima (Fong et al., J. Biol.Chem, 275 (6), (2000)). Por analogía, la estructura enrollada aleatoria rígida en combinación con los carbohidratos hidrofílicos ramificados hidrófilos que componen los dominios de mucina fuertemente glucosilados puede ser particularmente útil para proporcionar control de la separación entre los dos socios de fusión en cuanto al control de la longitud y rigidez de la separación entre dos socios de fusión.

Adicionalmente, los carbohidratos hidrofílicos ramificados hidrófilos que constituyen los dominios de mucina fuertemente glucosilados del ligador de polipéptidos del dominio de mucina son deseables para aumentar el radio hidrodinámico de la proteína de fusión más allá de lo que se esperaría solo con base en el peso molecular agregado. Dicho aumento en el radio hidrodinámico imparte cualidades deseables sobre la proteína de fusión tal como, por ejemplo, el aumento de la vida media en suero de una proteína de fusión terapéutica.

El alto nivel de glucosilación proporcionado por la adición de un ligador de polipéptidos de dominio de mucina también tiene el potencial de modificar las propiedades fisicoquímicas de una proteína tal como la carga, la solubilidad y las propiedades viscoelásticas de las soluciones concentradas de la proteína activa.

Un diseño de proteína de fusión combina la región o regiones de unión de un primer socio de fusión de polipéptidos a través de un ligador de la invención, a un segundo socio de fusión de polipéptido que es la totalidad o una porción de una inmunoglobulina. Generalmente, como el término se utiliza en la especificación, "inmunoglobulina" o "dominio de inmunoglobulina" pretende incluir todos los tipos de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.) de todas las fuentes (por ejemplo, humano, roedor, conejo, vaca, oveja, cerdo, perro, otro mamífero, pollo, pavo, emú, otras aves, etc.). Se prefieren inmunoglobulinas de humanos cuando las proteínas de fusión de la invención se utilizan para tratar humanos.

En una realización, uno o más socios de fusión de inmunoglobulina comprenden las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Normalmente, en dichas fusiones de terminal N, el polipéptido de fusión codificado retendrá por lo menos los dominios de bisagra, CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan en el extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente en el extremo N del CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera.

El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; los sitios particulares son bien conocidos y se pueden seleccionar para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de las proteínas de fusión. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la invención se ensamblan como monómeros, o hetero- u homo-multímeros, y particularmente como dímeros o tetrámeros como se conoce en la técnica. Aunque no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina, puede estar presente una cadena ligera de inmunoglobulina asociada covalentemente o fusionada directamente al polipéptido.

Los socios de fusión divulgados en este documento comprenden albúmina de suero o un dominio de albúmina de suero. Se puede preferir la albúmina sérica humana cuando las proteínas de fusión divulgadas en este documento se utilizan para tratar seres humanos. Los socios de fusión pueden comprender transferrina humana.

5 De particular interés son las proteínas de fusión para las que se busca un aumento en la bioactividad de la proteína de fusión en comparación con la misma fusión de proteínas activas en ausencia de un ligador de polipéptidos de dominio de mucina. También son de interés las proteínas de fusión para las cuales se busca un aumento en un parámetro farmacocinético tal como vida media en suero, solubilidad incrementada, estabilidad incrementada o alguna otra propiedad farmacéutica mejorada en comparación con la misma fusión de proteínas activas en ausencia
10 de un ligador de polipéptido de dominio de mucina.

La actividad de las composiciones de proteína de fusión de la invención, que incluyen las características funcionales o la actividad biológica y farmacológica y los parámetros que resultan, se pueden determinar mediante cualquier ensayo adecuado conocido en la técnica para medir la característica deseada. La actividad y estructura de los
15 proteínas de fusión se pueden medir mediante ensayos descritos en el presente documento, ensayos de los Ejemplos o mediante métodos conocidos en la técnica para determinar la vida media, el grado de solubilidad, la estructura y la retención de la actividad biológica de las proteínas de fusión de la invención así como las comparaciones con proteínas activas que no son proteínas de fusión de la invención. La cuantificación de los ensayos de actividad biológica (potencia) incluye, pero no se limita por, ensayos de unión in vitro (tales como ELISA, resonancia de plasmón superficial, ensayos de cambio térmico, RMN, sedimentación, proximidad de centelleo, FRET, anisotropía de fluorescencia), ensayos con base en células in vitro (tales como gen informador, fosforilación, diferenciación celular, crecimiento o viabilidad celular, complementariedad de enzimas, marcaje celular) y actividades farmacológicas in vivo (que incluyen modelos animales de enfermedad).

25 Las proteínas de fusión de la invención se pueden producir a través de medios de expresión estándar sin la necesidad de otras etapas de conjugación y purificación. Los ligadores de polipéptidos de dominio de mucina se pueden ligar a uno o ambos socios de fusión a través del extremo N o C del socio de fusión. Los ligadores de polipéptidos de dominio de mucina son estructuralmente menos restrictivos que otros socios de fusión porque son proteínas monoméricas no globulares que tienen un volumen reducido y un riesgo reducido de impacto sobre la
30 bioactividad.

Cuando se hace referencia a la proteína de fusión, el término "ligado" o "fusionado" o "fusión" pretende indicar que los ligadores de polipéptidos de dominio de mucina y los socios de fusión de polipéptido se expresan como un único polipéptido en células de una manera que permite la glucosilación ligada a O del polipéptido del dominio de mucina y
35 mantiene la actividad de la proteína activa.

Una proteína de fusión de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntos en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, al emplear extremos terminados romos o escalonados para la
40 ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los términos apropiados, rellenando de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automáticos. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes se puede llevar a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos
45 génicos consecutivos que pueden hibridar posteriormente y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992). Muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente para ayudar a las fracciones de fusión y se analizarán con más detalle a continuación.

50 Ligadores de polipéptidos de dominio de mucina

Un "ligador de polipéptido de dominio de mucina" se define en el presente documento como cualquier proteína que comprende un "dominio de mucina" capaz de unirse a uno o más socios de polipéptidos de fusión. Un dominio de mucina es rico en sitios de glucosilación potenciales, y tiene un alto contenido de serina y/o treonina y prolina, que
55 puede representar más del 40% de los aminoácidos dentro del dominio de mucina. Un dominio de mucina está muy glucosilado con glicanos predominantemente enlazados a O. Un polipéptido de dominio de mucina tiene por lo menos aproximadamente un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos 80%, o por lo menos 90% de su masa debido a los glucanos. Los dominios de mucina pueden comprender unidades de repetición de aminoácidos en tándem (también denominadas aquí TR) que pueden variar en longitud desde aproximadamente 8 aminoácidos hasta 150
60 aminoácidos por cada unidad de repetición en tándem. El número de unidades de repetición en tándem puede variar entre 1 y 25 en un polipéptido de dominio de mucina de la invención.

Los ligadores de polipéptidos de dominio de mucina de la invención comprenden la totalidad o una porción de una secuencia de polipéptidos de dominio de mucina codificada por un gen MUC seleccionado del grupo que consiste en
65 MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, , MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC 15, MUC16, MUC 17, MUC 19, MUC20, MUC21. Una "porción del mismo" significa que el ligador

depolipéptido de mucina comprende por lo menos un dominio de mucina de una proteína de mucina. El dominio de mucina de una proteína de mucina está normalmente flanqueado en ambos lados por regiones de aminoácidos no repetitivas. Un polipéptido de dominio de mucina puede comprender la totalidad o una porción de una proteína de mucina (por ejemplo, MUC20). Un polipéptido de dominio de mucina puede comprender la totalidad o una porción de una proteína de mucina de una proteína de mucina soluble. Preferiblemente, el polipéptido de dominio de mucina comprende la porción extracelular de una proteína de mucina.

Un polipéptido de dominio de mucina también puede comprender la totalidad o una porción de una proteína que comprende un dominio de mucina pero que no está codificada por un gen de MUC. Dichas proteínas de origen natural que no están codificadas por un gen MUC pero que comprenden dominios de mucina incluyen, pero no se limitan a, proteínas ancladas a membrana tales como inmunoglobulina de transmembrana y proteínas de la familia del dominio de mucina (TIM), fractalquina (neurotactina), selectina P ligando glicoproteico 1 (PSGL-1, CD162), CD34, CD43 (leucosialina, sialophorina), CD45, CD68, CD96, CD164, GlyCAM-1, MAdCAM, E-selectina, P-selectina, L-selectina, glicoplasas de glóbulos rojos, glucocalicina, glucoforina, LDL-R, ZP3, endosialina, factor de aceleración de decaimiento (daf, CD55), podocalixina, endoglican, alfa-distroglican, neurofascin, EMR1, EMR2, EMR3, EMR4, ETL y epiglicanina.

Un ligador de polipéptido de dominio de mucina también puede comprender un polipéptido no natural que tiene un dominio de mucina según se define dicho término en el presente documento. El polipéptido de dominio de mucina se puede diseñar de novo para que comprenda un dominio de mucina de acuerdo con la invención.

El ligador de polipéptidos del dominio de mucina puede no estar glucosilado por α 1,3, galactosiltransferasa o β 1,6-acetilglucosaminiltransferasa. La proteína de fusión puede no unirse a un anticuerpo específico para un α Gal. La proteína de fusión de la invención puede no unir un anticuerpo específico Gal α 1, Gal.

Un ligador de polipéptidos de dominio de mucina puede comprender dominios de repeticiones de aminoácidos en tándem que son ricos en Pro, Ser y Thr. En una realización de la invención, el número de unidades de repetición en tándem dentro de un ligador de polipéptidos de dominio de mucina de la invención está entre 1 y 25. Preferiblemente, el número de unidades de repetición en tándem dentro de un ligador de polipéptido de dominio de mucina está entre 2 y 20. Más preferiblemente, el número de unidades de repetición en tándem dentro de un polipéptido de dominio de mucina es por lo menos aproximadamente 4. El porcentaje de restos de serina y/o treonina y prolina dentro de un polipéptido de dominio de mucina de la invención puede ser de por lo menos 10%. Preferiblemente, el porcentaje de residuos de serina y/o treonina y prolina dentro de un polipéptido de dominio de mucina de la invención es por lo menos 20%. Más preferiblemente, el porcentaje de residuos de serina y/o treonina y prolina dentro de un polipéptido de dominio de mucina de la invención es mayor que 30%. Cada unidad de repetición de aminoácidos en tándem dentro del dominio de mucina puede estar compuesta de por lo menos 8 aminoácidos. Preferiblemente, cada unidad está compuesta de por lo menos 16 aminoácidos. Más preferiblemente, cada unidad está compuesta por por lo menos 19 aminoácidos, y cada unidad puede variar en longitud desde aproximadamente 19 aminoácidos hasta 150 aminoácidos.

El polipéptido de dominio de mucina puede comprender por lo menos 32 aminoácidos, que comprenden por lo menos 40% de serina, treonina y prolina. En una realización, un polipéptido de dominio de mucina de acuerdo con la invención comprende por lo menos 2, 4, 8, 10 o 12 unidades de repetición de aminoácidos en tándem de por lo menos 8 aminoácidos de longitud por unidad de repetición en tándem. Las secuencias de aminoácidos preferidas de una unidad de repetición en tándem incluyen, pero no se limitan a aquellas de la Tabla I. El polipéptido del dominio de mucina y/o ácidos nucleicos que codifican el polipéptido del dominio de mucina se pueden construir utilizando secuencias codificadoras de proteínas del dominio de mucina que son conocidos en la técnica y están disponibles públicamente a través de fuentes como GenBank.

Tabla 1

Nombre	Secuencia de aminoácidos de repetición en tándem (TR) (# de aa s)	Número de TR/MUC*	Número de Acceso+	Notas
MUC1	PAPGSTAPPAHGVT SAPDTR (20) [SEQ ID NO: 5]	21-125; 41 y 85 son más comunes	P15941	Existen múltiples variantes de MUC1
MUC2	ITTTTTVTPPTPTGTQPTTP (23) [SEQ ID NO: 6]	99	Q02817	Mayor TR; existen secuencias TR alternativas
MUC3 (A)	ITTTTSHDTPSFTSS (17) [SEQ ID NO: 7]	20	Q02505	Secuencia TR degenerada; también existe una larga secuencia rica en serina y rica en treonina
MUC4	ATPLPVTDTSSASTGH (16) [SEQ ID NO: 8]	145-395	Q99102	Secuencia degenerada TR, También existe una secuencia larga rica en serina y rica en treonina
MUC5AC	TTSTTAP (8) [SEQ ID NO: 9]	(46,17,34,58) [∞]	P98088	Secuencia de consenso T-T-S-T-T-S-A-P (SEQ ID NO: 9)
MUC5B	ATGSTATPSSTPGTTHTPPVLTSTA TTPT (29) [SEQ ID NO: 10]	(11,11,17,11,23) [∞]	Q9HC84	Secuencia TR degenerada
MUC6	PTS	NA	Q6W4X9	N/A
MUC7	TTAAPTTPSATTOAPPSSAPPE (23) [SEQ ID NO: 11]	5-6	Q8TAX7	Secuencia TR degenerada
MUC11/12	EESTTVHSSPGATGALFP (19) [SEQ ID NO: 12]	28	Q9UKN1	Secuencia consenso E-E-S-X-X-H-X-X-P-X-X-T-X-T-X-X-X-P (SEQ ID NO: 22)
MUC13	PTS	NA	Q9H3R2	
MUC14	PTS	NA		
MUC15	PTS	NA	Q8N387	
MUC16	PTS	NA	Q8WXI7	
MUC17	SSSPTPAEGTSMPTSTYSEGRPLTSMPTVSTT LVATSAISLSTTPVDISTPVTNSTEA (60) [SEQ ID NO: 13]	59-60	Q685J3	Secuencia TR degenerada
MUC19	PTS	NA	Q7Z5P9	Repeticiones de G-V-T-G-T-T-G-P-S-A (SEQ ID NO: 23)
MUC20	SESSASSDGPVTPSRA (19) [SEQ ID NO: 14]	11-12	Q8N307	
MUC21	ATNSESSTVSSGIST (15) [SEQ ID NO: 15]	28	Q5SSG8	Secuencia TR degenerada
MUC22	PTS	NA	E2RYF6	

Nombre	Secuencia de aminoácidos de repetición en tándem (TR) (# de aa's)	Número de TR/MUC*	Número de Acceso+	Notas
TIM-1	VPTTTT (6) [SEQ ID NO: 16]	11	Q96D42	Secuencia TR degenerada
TIM-4	PTS	NA	Q96H15	
Fractalkina	Región similar a mucina (PTS)	NA	P78423	
Macrosialina (CD68)	Región similar a mucina (PTS)	NA	P34810	
CD96	PTS	NA	P40200	
Endosialina	Región rica en Pro	NA	Q9HCU0	
DAF (CD55)	Región rica en Pro/Thr	NA	P08174	
Podocalixina	Región rica en Thr	NA	000592	
EMR1	Región rica en Ser/Thr	NA	Q14246	
PSGL-1	QTTQPAATEA (10) [SEQ ID NO: 17]	12	Q14242	Secuencia TR degenerada

Se omiten MUC8 y MUC9; no hay datos confiables
 Secuencia de PTS prolina/serina/treonina
 * aproximado; Se reporta el número TR como un rango en la mayoría de los casos
 + Número de Uniprot
 ∞ El número n de TR es diferente en regiones específicas
 NA No anunciado

Alternativamente, el ligador de polipéptidos de dominio de mucina se proporciona como un polipéptido variante del dominio de mucina que tiene una mutación en la secuencia de dominio de mucina de origen natural de una proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, el ligador de polipéptido de mutadominio variante comprende sitios de glucosilación ligados a O adicionales en comparación con el polipéptido de dominio de mucina de tipo silvestre. Alternativamente, el polipéptido variante de dominio de mucina comprende mutaciones de secuencia de aminoácidos que dan como resultado un número incrementado de residuos de serina, treonina o prolina en comparación con un polipéptido de dominio de mucina de tipo silvestre. Alternativamente, las secuencias de polipéptido de dominio de mucina variantes comprenden carga agregada o sustraída residuos, que incluyen, pero no se limitan a, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, histidina y arginina, que cambian el pI o la carga de la molécula a un pH particular.

Proteína activa y proteína activa terapéutica

Como se utiliza en el presente documento, una "proteína activa" cuando se refiere a un socio de fusión de polipéptido significa una proteína de interés o función biológica, terapéutica, profiláctica o de diagnóstico y/o es capaz de mediar en una actividad biológica. Una "proteína terapéutica activa" como se utiliza este término en el presente documento cuando se refiere a un socio de fusión de polipéptido, es una proteína que es capaz de prevenir o mejorar una enfermedad, trastorno o afección cuando se administra a un sujeto. Una proteína activa o proteína terapéutica activa de acuerdo con la invención se refiere a una fusión con un dominio Fc de una inmunoglobulina, o cualquier fragmento de la misma, la proteína activa se selecciona de sTNFR2, CTLA4, TACI, LFA, IL-1RI, IL1-1Ra, IL1-1RAcP, receptor de VEGF, GLP-1, exendina-4, o una secuencia de aminoácidos homóloga a cualquiera de los anteriores con por lo menos un 95% de identidad a nivel de aminoácidos.

Una proteína activa de la invención puede ser una proteína nativa, de longitud completa, o puede ser una proteína de longitud completa permutada circularmente, o puede ser un fragmento o una variante de secuencia de una proteína activa, o puede ser un fragmento permutada circularmente o variante de secuencia permutada circularmente de una proteína activa, que retiene por lo menos una porción de la actividad terapéutica de la proteína activa nativa. En una realización, las proteínas activas de acuerdo con la invención pueden ser un polipéptido recombinante con una secuencia que corresponde a una proteína encontrada en la naturaleza. En otra realización, las proteínas activas pueden ser variantes de secuencia, fragmentos, homólogos y miméticos de una secuencia natural, o variantes de secuencia permutadas circularmente, fragmentos, homólogos y miméticos de una secuencia natural que retienen por lo menos una porción de la actividad biológica de la proteína activa nativa.

Una proteína activa cuando se refiere a un socio de fusión de polipéptidos de la invención puede ser ella misma un polipéptido de fusión. En una realización, dicha proteína activa que es en sí misma un polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión que comprende dos o más proteínas nativas de longitud completa o dos o más proteínas de longitud completa permutadas circularmente, o fragmentos o variantes de secuencia de dos o más proteínas, o fragmentos circularmente permutados o variantes de secuencia permutadas circularmente de dos o más proteínas activas. En una realización adicional, dicha proteína activa que es ella misma un polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión que comprende una o más combinaciones de proteínas nativas de longitud completa, proteínas de longitud completa permutadas circularmente, fragmentos o variantes de secuencia de proteínas activas, fragmentos permutados circularmente o variantes de secuencia permutadas circularmente de proteínas activas, que retienen por lo menos una parte de la actividad biológica de las proteínas activas nativas. En otra realización, la proteína activa que es en sí misma un polipéptido de fusión de acuerdo con la invención puede comprender un polipéptido de fusión recombinante con secuencias correspondientes a proteínas encontradas en la naturaleza. En otra realización, la proteína activa que es en sí misma un polipéptido de fusión puede ser variantes de secuencia, fragmentos, homólogos y miméticos de secuencias naturales, o variantes de secuencia permutadas circularmente, fragmentos, homólogos y miméticos de secuencias naturales que retienen por lo menos una porción de la actividad biológica de las proteínas activas nativas.

En una realización de la invención, el polipéptido biológicamente activo es GLP-1.

En una realización preferida de la invención, el polipéptido activo que es Anakinra, una forma recombinante no glucosilada del antagonista del receptor de interleucina-1 humano (IL-1Ra). En un caso, Anakinra consiste en 153 aminoácidos y tiene un peso molecular de 17.3 kilodaltons. Se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando un sistema de expresión bacteriano de E. coli.

Se divulgan en este documento proteínas activas que pueden ser una secuencia que presenta por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, o alternativamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la proteína activa nativa o una variante de una proteína activa nativa. Dichas proteínas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: péptidos bioactivos (tales como GLP-1, exendina-4, oxitocina, péptidos opiáceos), citoquinas, factores de crecimiento, quimiocinas, linfoquinas, ligandos, receptores, hormonas, enzimas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de dominio, nanoanticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, andamios alternativos de anticuerpos modificados genéticamente tales como DARPin, cenitinas, adnectinas y factores de crecimiento. Los ejemplos de receptores incluyen el dominio extracelular de receptores asociados a membrana (tales como TNFR1, TNFR2, los receptores de VEGF, IL-1R1, IL-1RAcP, IL-4, receptor hGH, CTLA-4, PD-1, IL-6R α , FGF receptores,

receptores de citoquinas o proteínas accesorias), receptores solubles que se han dividido de sus dominios de transmembrana, receptores 'maniquí' o 'señuelo' (tales como IL-1RII, TNFRSF11B, DcR3), y cualquier receptores solubles modificados química o genéticamente. Ejemplos de enzimas incluyen proteína C activada, factor VII, colagenasa; agalsidasa-beta; dornasa-alfa; alteplasa; asparaginasa pegilada; asparaginasa; e imiglucerasa. Ejemplos de polipéptidos o proteínas específicas incluyen, pero no se limitan a factor de estimulación de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor de estimulación de colonias granulocíticas (G-CSF), factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de estimulación de colonias (CSF), interferón beta (IFN-β), interferón gamma (IFNγ), factor inductor de interferón gamma I (IGIF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), RANTES (regulado tras la activación, células T normales expresadas y presuntamente secretadas), proteínas inflamatorias de macrófagos (por ejemplo, MIP-1-α y MIP-1-β, factor de iniciación de alargamiento de Leishmania (LEIF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos, (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-2 (NT-2), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), neurotrofina-5 (NT-5), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), receptor de TNF a tipo II, eritropoyetina (EPO), insulina y glucoproteínas solubles, por ejemplo, glucoproteínas gp120 y gp160. La glucoproteína gp120 es una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y la glucoproteína gp160 es un precursor conocido de la glucoproteína gp120.

Los ejemplos de polipéptidos biológicamente activos incluyen nesiritide, de tipo B humano péptido natriurético (BNPh), secretina, que es una hormona de péptido compuesta por una secuencia de aminoácidos idéntica a la secretina porcina de origen natural que consiste en 27 aminoácidos, enfuvirtida, una polipéptido sintético de 36 aminoácidos lineal que es un inhibidor de la fusión de VIH-1 con células CD4+, bivalirudina, un inhibidor de trombina directo específico y reversible, factor antihemofílico (AHF) eritropoyetina, una glucoproteína de 165 aminoácidos fabricada por tecnología de ADN recombinante que tiene los mismos efectos biológicos que la eritropoyetina endógena, o Reteplasa, una muteína de delección no glucosilada del activador del plasminógeno tisular (tPA), que comprende el kringle 2 y los dominios de proteasa del tPA humano.

Otro polipéptido activo es Becaplermin que es un factor de crecimiento recombinante derivado de plaquetas humanas (rhPDGF-BB) para administración tópica. Becaplermin puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante mediante la inserción del gen de la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Una forma de Becaplermin tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kD y es un homodímero compuesto por dos cadenas de polipéptidos idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Otro polipéptido activo puede ser Oprelvekin, que es una forma recombinante de interleucina once (IL-11) que se produce en *Escherichia coli* (E. coli) mediante tecnología de ADN recombinante. El polipéptido biológicamente activo seleccionado puede tener una masa molecular de aproximadamente 19,000 daltons, y no estar glucosilado. El polipéptido tiene 177 aminoácidos de longitud y difiere de la longitud de 178 aminoácidos de la IL-11 nativa solo en que carece del residuo de prolina amino-terminal, que se sabe que no da como resultado diferencias cuantificables en la bioactividad in vitro o in vivo. Otro polipéptido biológicamente activo es el glucagón, una hormona de polipéptidos idéntica al glucagón humano que aumenta la glucosa en sangre y relaja los músculos lisos del tracto gastrointestinal. El glucagón se puede sintetizar en una cepa de laboratorio especial no patógena de la bacteria E. coli que ha sido genéticamente alterada por la adición del gen para el glucagón. El glucagón puede ser un polipéptido de cadena sencilla que contiene 29 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 3.483.

El G-CSF es otro polipéptido activo. El factor de estimulación de colonias de granulocitos recombinantes o G-CSF se utiliza después de diversos tratamientos de quimioterapia para estimular la recuperación de glóbulos blancos.

Otro polipéptido biológicamente activo es el interferón alfa (IFN alfa). Químicamente, el interferón 2a modificado con PEG está clínicamente validado para el tratamiento de la hepatitis C. Otro polipéptido activo es el interferón gamma.

Otro polipéptido biológicamente activo de un socio de fusión de polipéptidos es IL6 permutado circularmente. Otro polipéptido biológicamente activo de un socio de fusión de polipéptidos es en sí mismo un polipéptido de fusión que comprende IL-6 permutado circularmente y el dominio D1 no permutado de gp130.

Las proteínas celulares adicionales incluyen, pero no se limitan a: VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, Her-1, Her-2, Her-3, EGF-1, EGF-2, EGF-3, Alfa3, cMet, ICOS, CD40L, LFA-1, c-Met, ICOS, LFA-1, IL-6, B7.1, B7.2, OX40, IL-1b, TACI, IgE, BAFF, o BLys, TPO-R, CD19, CD20, CD22, CD33, CD28, IL-1-R1, TNFα, TRAIL-R1, Receptor 1 de Complemento, FGFα, Osteopontina, Vitronectina, Efrina A1-A5, Efrina B1-B3, alfa-2-macroglobulina, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CXCL16, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, PDGF, TGFβ, GMCSF, SCF, p40 (IL12/1L23), IL1b, IL1a, IL1ra, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL15, IL23, Fas, FasL, Flt3 ligand, 41 BB, ACE, ACE-2, KGF, FGF-7, SCF, Netrin1,2, IFNα,b,g, Caspasa-2,3,7,8,10, ADAM S1,S5,8,9,15,TS1,TS5; Adiponectina, ALCAM, ALK-1, APRIL, Anexina V, Angiogenina, Amfiroglutina, Angiopoietina-1,2,4, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1, B7-H2, B7-H3, Bc1-2, BACE-1, BAK, BCAM, BDNF, bNGF, bECGF, BMP2,3,4,5,6,7,8; CRP, Caderina-6,8,11; Catepsina A, B, C, D, E, L, S, V, X; CD11a/LFA-1, LFA-3, GP2b3a, receptor GH, proteína RSV F, IL-23 (p40, p19),

IL-12, CD80, CD86, CD28, CTLA-4, a4P1, a4137, TNF/Linfotoxina, IgE, CD3, CD20, IL-6, IL-6R, BLYS/BAFF, IL-2R, HER2, EGFR, CD33, CD52, Digoxin, Rho (D), Varicela, Hepatitis, CMV, Tétanos, Vaccinia, Antivenom, Botulinum, Trail-R1, Trail-R2, cMet, TNF-R family, tal como LA NGF-R, CD27, CD30, CD40, CD95, receptor de Limfotoxina a/b, Wsl-1, TL1A/TNFSF15, BAFF, BAFF-R/TNFRSF13C, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R2/TNFRSF10B, Fas/TNFRSF6 CD27/TNFRSF7, DR3/TNFRSF25, HVEM/TNFRSF14, TROY/TNFRSF19, CD40 Ligando/TNFSF5, BCMA/TNFRSF17, CD30/TNFRSF8, LIGHT/TNFSF14, 4-1BB/TNFRSF9, CD40/TNFRSF5, GITR/TNFRSF18, Osteoprotegerina/TNFRSF11B, RANK/TNFRSF11A, TRAIL R3/TNFRSF10C, TRAIL/TNFSF10, TRANCE/RANK L/TNFSF11, 4-1BB Ligando/TNFSF9, TWEAK/TNFSF12, CD40 Ligando/TNFSF5, Fas Ligando/TNFSF6, RELT/TNFRSF19L, APRIL/TNFSF13, DcR3/TNFRSF6B, TNF R1/TNFRSF1A, TRAIL R1/TNFRSF10A, TRAIL R4/TNFRSF10D, CD30 Ligando/TNFSF8, GITR Ligando/TNFSF18, TNFSF18, TAC1/TNFRSF13B, NGF R/TNFRSF16, OX40 Ligando/TNFSF4, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R3/TNFRSF10C, TWEAK R/TNFRSF12, BAFF/BLYS/TNFSF13, DR6/TNFRSF21, TNF-alfa/TNFSF1A, Pro-TNF-alfa/TNFSF1A, Linfotoxina beta R/TNFRSF3, Linfotoxina beta R (LTbR)/Fc Chimera, TNF R1/TNFRSF1A, TNF-beta/TNFSF1B, PGRPS, TNF R1/TNFRSF1A, TNF RII/TNFRSF1B, EDA-A2, TNF-alfa/TNFSF1A, EDAR, XEDAR, TNF R1/TNFRSF1A 4EBP1, 14-3-3 zeta, 53BP1, 2B4/SLAMF4, CCL21/6Ckine, 4-1BB/TNFRSF9, 8D6A, 4-1BB Ligando/TNFSF9, 8-oxo-dG, 4-Amino-1,8-nafalimida, A2B5, Aminopeptidasa LRAP/ERAP2, A33, Aminopeptidasa N/ANPEP, Aag, Aminopeptidasa P2/XPNPEP2, ABCG2, Aminopeptidasa P1/XPNPEP1, ACE, Aminopeptidasa PILS/ARTS1, ACE-2, Amnionless, Actina, Amfregulina, beta-Actina, AMPK alfa 1/2, Activina A, AMPK alfa 1, Activina AB, AMPK alfa 2, Activina B, AMPK beta 1, Activina C, AMPK beta 2, Activina RIA/ALK-2, andrógeno R/NR3C4, Activina RIB/ALK-4, Angiogenin, Activina RIIA, Angiopoietina-1, Activina RUB, Angiopoietina-2, ADAMS, Angiopoietina-3, ADAM9, Angiopoietina-4, ADAM10, Angiopoietin similar a 1, ADAM12, Angiopoietina similar a 2, ADAM15, Angiopoietina similar a 3, TACE/ADAM17, Angiopoietina similar a 4, ADAM19, Angiopoietina similar a 7/CDT6, ADAM33, Angiostatina, ADAMTS4, Anexina A1/Anexina I, ADAMTSS, Anexina A7, ADAMTS1, Anexina A10, ADAMTSL-1/Punctin, Anexina V, Adiponectina/Acrp30, ANP, AEBSF, AP Site, Aggrecan, APAF-1, Agrin, APC, AgRP, APE, AGTR-2, APT, AIF, APLP-1, Akt, APLP-2, Akt1, Apolipoproteína A1, Akt2, Apolipoproteína B, Akt3, APP, Albúmina de suero, APRIL/TNFSF13, ALCAM, ARC, ALK-1, Artemina, ALK-7, Arilsulfatasa A/ARSA, Fosfatasa alcalina, ASAH2/N-acilesfingosina Amidohidrolasa-2, alfa 2u-Globulina, ASC, Glucoproteína alfa-1-ácida, ASGR1, alfa-Fetoproteína, ASK1, ALS, ATM, Ameloblastina, ATRIP, AMICA/JAML, Aurora A, AMIGO, Aurora B, AMIGO2, Axin-1, AMIGO3, Ax1, Aminoacilasa/ACY1, Azurocidina/CAP37/HBP, Aminopeptidasa A/ENPEP, B4GALT1, BIM, B7-1/CD80, 6-Biotina-17-NAD, B7-2/CD86, BLAME/SLAMF8, B7-H1/PD-L1, CXCL13/BLC/BCA-1, B7-H2, BLIMP1, B7-H3, BIK, B7-H4, BMI-1, BACE-1, BMP-1/PCP, BACE-2, BMP-2, Bad, BMP-3, BAFF/TNFSF13B, BMP-3b/GDF-10, BAFF R/TNFRSF13C, BMP-4, Bag-1, BMP-5, BAK, BMP-6, BAMBI/NMA, BMP-7, BARD1, BMP-8, Bax, BMP-9, BCAM, BMP-10, Bc1-10, BMP-15/GDF-9B, Bc1-2, BMPR-IA/ALK-3, proteína A1 relacionada con Bc1-2, BMPR-IB/ALK-6, Bc1-w, BMPR-II, Bc1-x, BNIP3L, Bc1-xL, BOC, BCMA/TNFRSF17, BOK, BDNF, BPDE, Benzamida, Brachiuri, Cadena beta Común, B-Raf, beta IGH3, GXCL14/BRAK, Betacellulina, BRCA1, beta-Defensin 2a, BRCA2, BID, BTLA, Biglcan, Bub-1, Bik similar a Killer Proteína, c-jun, CD90/Thy1, c-Rel, CD94, CCL6/C10, CD97, C1q R1/CD93, CD151, C1qTNF1, CD160, C1qTNF4, CD163, C1qTNF5, CD164, Componente de Complemento C1r, CD200, Componente de Complemento C1s, CD200 R1, Componente de Complemento C2, CD229/SLAMF3, Componente de Complemento C3a, CD23/Fc epsilon RII, Componente de Complemento C3d, CD2F-10/SLAMF9, Componente de Complemento CSa, CDSL, Caderina-4/R-Caderina, CD69, Caderina-6, CDC2, Caderina-8, CDC25A, Caderina-11, CDC25B, Caderina-12, CDCP1, Caderina-13, CDO, Caderina-17, CDX4, E-Caderina, CEACAM-1/CD66a, N-Caderina, CEACAM-6, P-Caderina, Cerberus 1, VE-Caderina, CFTR, Calbindina D, cGMP, Calcineurina A, Chem R23, Calcineurina B, Chemerin, Calreticulina-2, Paquetes Muestradores de Quimioquina, CaM Quinasa II, Quitinasa 3 similar a 1, cAMP, Quitotriosidase/CHIT1, Cannabinoide R1, Chk1, Cannabinoide R2/CB2/CNR2, Chk2, CAR/NR113, CHL-1/L1CAM-2, Anhidrasa Carbónica I, Colina Acetiltransferasa/ChAT, Anhidrasa Carbónica II, Condrolectina, Anhidrasa Carbónica III, Chordin, Anhidrasa Carbónica IV, Cordin similar a 1, Anhidrasa Carbónica Va., Cordin similar a 2, Anhidrasa Carbónica VB, CINC-1, Anhidrasa Carbónica VI, CINC-2, Anhidrasa Carbónica VII, CINC-3, Anhidrasa Carbónica VIII, Claspin, Anhidrasa Carbónica IX, Claudin-6, Anhidrasa Carbónica X, CLC, Anhidrasa Carbónica XII, CLEC-1, Anhidrasa Carbónica XIII, CLEC-2, Anhidrasa Carbónica XIV, CLECSF13/CLEC4F, Carboximetil Lisina, CLECSF8, Carboxipeptidasa A1/CPA1, CLF-1, Carboxipeptidasa A2, CLP1/COLEC12, Carboxipeptidasa A4, Clusterina, Carboxipeptidasa B1, Clusterina similar a 1, Carboxipeptidasa E/CPE, CMG-2, Carboxipeptidasa X1, CMV UL146, Cardiotrofina-1, CMV UL147, Carnosina Dipeptidasa 1, CNP, Caronte, CNTF, CART, CNTF R alfa, Caspasa, Factor de Coagulación II/Trombina, Caspasa-1, Factor de Coagulación III/Factor de Tejido, Caspasa-2, Factor de Coagulación VII, Caspasa-3, Factor de Coagulación X, Caspasa-4, Factor de Coagulación XI, Caspasa-6, Factor de Coagulación XIV/Proteína C, Caspasa-7, COCO, Caspasa-8, Cohesina, Caspasa-9, Colágeno I, Caspasa-10, Colágeno II, Caspasa-12, Colágeno IV, Caspasa-13, Cadena Gama Común /IL-2 R gamma, Inhibidores de Péptido Caspasa, COMP/Trombospondina-5, Catalase, Componente de Complemento C1rLP, beta-Catenina, Componente de Complemento C1qA, Catepsina 1, Componente de Complemento C1qC, Catepsina 3, Factor de Complemento D, Catepsina 6, Factor de Complemento I, Catepsina A, Complemento MASP3, Catepsina B, Connexina 43, Catepsina C/DPPI, Contactina-1, Catepsina D, Contactina-2/TAG1, Catepsina E, Contactina-4, Catepsina F, Contactina-5, Catepsina H, Corina, Catepsina L, Cornulina, Catepsina O, CORS26/C1qTNF, 3, Catepsina S, Células Madre Corticales de Rata, Catepsina V, Cortisol, Catepsina X/Z/P, COUP-TF I/NR2F1, CBP, COUP-TF II/NR2F2, CCI, COX-1, CCK-A R, COX-2, CCL28, CRACC/SLAMF7, CCR1, C-proteína reactiva, CCR2, Creatine Quinasa, Músculo/CKMM, CCR3, Creatinina, CCR4, CREB, CCR5, CREG, CCR6, CRELD1, CCR7, CRELD2, CCR8, CRHBP, CCR9, CRHR-1, CCR10, CRIM1, CD155/PVR, Cripto, CD2, CRISP-2, CD3, CRISP-3, CD4, Crossveinless-2, CD4+/45RA-, CRTAM, CD4+/45RO-,

CRTH- 2, GD4+/CD62L-/CD44, CRY1, CD4+/CD62L+/CD44, Cryptic, CD5, CSB/ERCC6, CD6, CCL27/CTACK, CD8, CTGF/CCN2, CD8+/45RA-, CTLA-4, CD8+/45RO-, Cubilin, CD9, CX3CR1, CD14, CXADR, CD27/TNFRSF7, CXCL16, CD27 Ligando/TNFSF7, CXCR3, CD28, CXCR4, CD30/TNFRSF8, CXCR5, CD30 Ligando/TNFSF8, CXCR6, CD31/PECAM-1, Ciclofilina A, CD34, Cyr61/CCN1, CD36/SR-B3, Cistatina A, CD38, Cistatina B, CD40/TNFRSF5, Cistatina C, CD40 Ligando/TNFSF5, Cistatina D, CD43, Cistatina E/M, CD44, Cistatina F, CD45, Cistatina H, CD46, Cistatina H2, CD47, Cistatina S, CD48/SLAMF2, Cistatina SA, CD55/DAF, Cistatina SN, CD58/LFA-3, Clytocromo c, CD59, ApocyEP 2 858 672 B1 tocromo c, CD68, Holocitochrome c, CD72, Citoqueratina 8, CD74, Citoqueratina 14, CD83, Citoqueratina 19, CD84/SLAMF5, Citonina, D6, DISP1, DAN, Dkk-1, DANCE, Dkk-2, DARPP-32, Dkk-3, DAX1/NROB1, Dkk-4, DCC, DLEC, DCIR/CLEC4A, DLL1, DCAR, DLL4, DcR3/TNFRSF6B, d-Luciferina, DC-SIGN, ADN Ligasa IV, DC-SIGNR/CD299, beta polimerasa de ADN, DcTRAIL R1/TNFRSF23, ADNM-1, DcTRAIL R2/TNFRSF22, ADN-PKcs, DDR1, DNER, DDR2, Dopa Decarboxilase/ DDC, DEC-205, DPCR-1, Decapentaplegic, DPP6, Decorina, DPPA4, Dectin-1/CLEC7A, DPPA5/ESG1, Dectina- 2/CLEC6A, DPPII/QPP/DPP7, DEP-1/CD148, DPPIV/CD26, Desert Hedgehog, DR3/TNFRSF25, Desmin, DR6/TNFRSF21, Desmoglein-1, DSCAM, Desmoglein-2, DSCAM-L1, Desmoglein-3, DSPG3, Dishevelled-1, Dtk, Dishevelled- 3, Dynamin, EAR2/NR2F6, EphA5, ECE-1, EphA6, ECE-2, EphA7, ECF-L/CHI3L3, EphA8, ECM-1, EphB1, Ecotin, EphB2, EDA, EphB3, EDA-A2, EphB4, EDAR, EphB6, EDG-1, Efrina, EDG-5, Efrina-A1, EDG-8, Efrina-A2, eEF-2, Efrina-A3, EGF, Efrina-A4, EGF R, Efrina-A5, EGR1, Efrina-B, EG-VEGF/PK1, Efrina-B1, eIF2 alfa, Efrina- B2, eIF4E, Efrina-B3, Elk-1, Epigen, EMAP-II, Epimorfina/Syntaxin 2, EMMPRIN/CD147, Epiregulin, CXCL5/ENA, EPR-1/Xa Receptor, Endocan, ErbB2, Endoglin/CD105, ErbB3, Endoglican, ErbB4, Endonucleasa III, ERCC1, Endonucleasa IV, ERCC3, Endonucleasa V, ERK1/ERK2, Endonucleasa VIII, ERK1, Endorepelin/Perlecan, ERK2, Endostatina, ERK3, Endotelina-1, ERK5/BMK1, Engrailed-2, ERR alfa/NR3B1, EN-RAGE, ERR beta/NR3B2, Enteropeptidasa/ Enteroquinasa, ERR gamma/NR3B3, CCL11/Eotaxina, Eritropoietina, CCL24/Eotaxin-2, Eritropoietina R, CCL26/Eotaxin-3, ESAM, EpCAM/TROP-1, ER alfa/NR3A1, EPCR, ER beta/NR3A2, Eph, Exonucleasa III, EphA1, Exostosina similar a 2/EXTL2, EphA2, Exostosina similar a 3/EXTL3, EphA3, FABP1, FGF-BP, FABP2, FGF R1-4, FABP3, FGF R1, FABP4, FGF R2, FABP5, FGF R3, FABP7, FGF R4, FABP9, FGF R5, Factor de Complemento B, Fgr, FADD, FHR5, FAM3A, Fibronectina, FAM3B, Ficolina-2, FAM3C, Ficolina-3, FAM3D, FITC, Proteína alfa de Activación de Fibroblasto/FAP, FKBP38, Fas/TNFRSF6, Flap, Ligando Fas /TNFSF6, FLIP, FATP1, FLRG, FATP4, FLRT1, FATP5, FLRT2, Fc gamma R1/CD64, FLRT3, Fc gamma RIIB/CD32b, Flt-3, Fc gamma RIIC/CD32c, Flt-3 Ligand, Fc gamma RIIA/CD32a, Follistatina, Fc gamma RIII/CD16, Follistatina similar a 1, FcRH1/IRTA5, FosB/G0S3, FcRH2/IRTA4, FoxD3, FcRH4/IRTA1, FoxJ1, FcRH5/IRTA2, FoxP3, Receptor Fc similar a 3/CD16-2, Fpg, FEN-1, FPR1, Fetuin A, FPRL1, Fetuin B, FPRL2, FGF acidic, CX3CL1/Fractalkine, FGF basic, Frizzled-1, FGF-3, Frizzled-2, FGF-4, Frizzled-3, FGF-5, Frizzled-4, FGF-6, Frizzled- 5, FGF-8, Frizzled-6, FGF-9, Frizzled-7, FGF-10, Frizzled-8, FGF-11, Frizzled-9, FGF-12, Frk, FGF-13, sFRP-1, FGF- 16, sFRP-2, FGF-17, sFRP-3, FGF-19, sFRP-4, FGF-20, Furin, FGF-21, FXR/NR1H4, FGF-22, Fyn, FGF-23, G9a/EHMT2, GFR alfa-3/GDNF R alfa-3, GABA-A-R alfa 1, GFR alfa-4/GDNF R alfa-4, GABA-A-R alfa 2, GITR/TNFRSF18, GABA-A-R alfa 4, GITR Ligando/TNFSF18, GABA-A-R alfa 5, GLI-1, GABA-A-R alfa 6, GLI-2, GABA-A-R beta 1, GLP/EHMT1, GABA-A-R beta 2, GLP-1 R, GABA-A-R beta 3, Glucagón, GABA-A-R gamma 2, Glucosamina (N-acetyl)-6-Sulfatase/GNS, GABA-B-R2, GluRI, GAD1/GAD67, GluR2/3, GAD2/GAD65, GluR2, GADD45 alfa, GluR3, GADD45 beta, Glut1, GADD45 gamma, Glut2, Galectina-1, Glut3, Galectina-2, Glut4, Galectina- 3, GlutS, Galectina-3 BP, Glutaredoxin 1, Galectina-4, Glycine R, Galectina-7, Glucophorin A, Galectina-8, Glupican 2, Galectina- 9, Glupican 3, Ga1NAc4S-65T, Glupican 5, GAP-43, Glupican 6, GAPDH, GM-CSF, Gas1, GM-CSF R alfa, Gas6, GMF-beta, GASP-1/WFIKKNRP, gp130, GASP-2/WFIKKN, Glucogen Fosforilasa BB/GPBB, GATA-1, GPR15, GATA-2, GPR39, GATA-3, GPVI, GATA-4, GR/NR3C1, GATA-5, Gr-1/Ly-6G, GATA-6, Granulisinina, GBL, Granzima A, GCNF/NR6A1, Granzima B, CXCL6/GCP-2, Granzima D, G-CSF, Granzima G, G-CSF R, Granzima H, GDF-1, GRASP, GDF-3 GRB2, GDF-5, Gremlina, GDF-6, GRO, GDF-7, CXCL1/GRO alfa, GDF-8, CXCL2/GRO beta, GDF-9, CXCL3/GRO gamma, GDF-11, Hormonona de Crecimiento, GDF-15, Hormonona de Crecimiento R, GDNF, GRP75/HSPA9B, GFAP, GSK-3 alfa/beta, GFI-1, GSK-3 alfa, GFR alfa-1/GDNF R alfa-1, GSK-3 beta, GFR alfa-2/GDNF R alfa-2, EGN1T, H2AX, Histidina, H60, HM74A, HAI-1, HMGA2, HAI-2, HMGB1, HAI-2A, TCF-2/HNF-1 beta, HAI-2B, HNF-3 beta/FoxA2, HAND1, HNF-4 alfa/NR2A1, HAPLN1, HNF-4 gamma/NR2A2, Tripsina de vías respiratorias similar a Proteasa/HAT, HO-1/HMOX1/HSP32, HB-EGF, HO-2/HMOX2, CCL14a/HCC-1, HPRG, CCL14b/HCC-3, Hrk, CCL16/HCC-4, HRP-1, alfa HCG, HS6ST2, Hck, HSD-1, HCR/CRAM-A/B, HSD-2, HDGF, HSP10/EPF, Hemoglobina, HSP27, Hepassocina, HSP60, HES-1, HSP70, HES-4, HSP90, HGF, HTRA/Proteasa Do, Activador de HGF, HTRA1/PRSS11, HGF R, HTRA2/Omi, HIF-1 alfa, HVEM/TNFRSF14, HIF-2 alfa, Hialuronan, HIN-1/Secretoglobulina 3A1,4-Hidroxinonenal, Hip, CCL1/1-309/TCA-3, IL-10, cIAP (pan), IL-10 R alfa, cIAP-1/HIAP-2, IL-10 R beta, cIAP-2/HIAP-1, IL-11, IBSP/Sialoproteína II, IL-11 R alfa, ICAM-1/CD54, IL-12, ICAM-2/CD102, IL-12/IL-23 p40, ICAM-3/CD50, IL-12 R beta 1, ICAM- 5, IL-12 R beta 2, ICAT, IL-13, ICOS, IL-13 R alfa 1, Iduronato 2-Sulfatasa/IDS, IL-13 R alfa 2, IFN, IL-15, IFN-alfa, IL-15 R alfa, IFN-alfa 1, IL-16, IFN-alfa 2, IL-17, IFN-alfa 4b, IL-17 R, IFN-alfa A, IL-17 RCC, IFN-alfa B2, IL- 17 RD, IFN-alfa C, IL-17B, IFN-alfa D, IL-17B R, IFN-alfa F, IL-17C, IFN-alfa G, IL-17D, IFN-alfa H2, IL-17E, IFN-alfa I, IL-17F, IFN-alfa J1, IL-18/IL-1F4, IFN-alfa K, IL-18 BPa, IFN-alfa WA, IL-18 BPc, IFN-alfa/beta R1, IL-18 BPd, IFN-alfa/beta R2, IL-18 R alfa/IL-1 R5, IFN-beta, IL-18 R beta/IL-1 R7, IFN-gamma, IL-19, IFN-gamma R1, IL-20, IFN-gamma R2, IL-20 R alfa, IFN-omega, IL-20 R beta, IgE, IL-21, IGFBP-1, IL-21 R, IGFBP-2, IL-22, IGFBP-3, IL-22 R, IGFBP-4, IL-22BP, IGFBP-5, IL-23, IGFBP-6, IL-23 R, IGFBP-L1, IL-24, IGFBP-rp1/IGFBP-7, IL- 26/AK155, IGFBP-rp10, IL-27, IGF-I, IL-28A, IGF-I R, IL-28B, IGF-II, IL-29/IFN-lambda 1, IGF-II R, IL-31, IgG, IL-31 RA, IgM, IL-32 alfa, IGSF2, IL-33, IGSF4A/SynCAM, ILT2/CD85j, IGSF4B, ILT3/CD85k, IGSF8, ILT4/CD85d, IgY, ILT5/CD85a, Ikb-beta, ILT6/CD85e, IKK alfa, Indian Hedgehog, IKK epsilon, INSR, IKK gamma, Insulina, IL-1 alfa/IL- 1F1, Insulina R/CD220, IL-1 beta/IL-1F2, Proinsulina, IL-1ra/IL-1F3, Insulinina/IDE, IL-

1F5/FIL1 delta, Integrina alfa 2/CD49b, IL-1F6/FIL1 epsilon, Integrina alfa 3/CD49c, IL-1F7/FIL1 zeta, Integrina alfa 3
 beta 1/VLA-3, IL-1F8/FIL1 eta, Integrina alfa 4/CD49d, IL-1F9/IL-1H1, Integrina alfa 5/CD49e, IL-1F10/IL-1HY2,
 Integrina alfa 5 beta 1, IL-1 R1, Integrina alfa 6/CD49f, IL-1 RII, Integrina alfa 7, IL-1 R3/IL-1 R AcP, Integrina alfa 9,
 5 IL-1 R4/ST2, Integrina alfa E/CD103, IL-1 R6/IL-1 R rp2, Integrina alfa L/CD11a, IL-1 R8, Integrina alfa L beta 2, IL-1
 R9, Integrina alfa M/CD11b, IL-2, Integrina alfa M beta 2, IL-2 R alfa, Integrina alfa V/CD51, IL-2 R beta, Integrina
 alfa V beta 5, IL-3, Integrina alfa V beta 3, IL-3 R alfa, Integrina alfa V beta 6, IL-3 R beta, Integrina alfa X/CD11c, IL-
 4, Integrina beta 1/CD29, IL-4 R, Integrina beta 2/CD18, IL-5, Integrina beta 3/CD61, IL-5 R alfa, Integrina beta 5, IL-
 6, Integrina beta 6, IL-6 R, Integrina beta 7, IL-7, CXCL10/IP-10/CRG-2, IL-7 R alfa/CD127, IRAK1, CXCR1/IL-8 RA,
 10 IRAK4, CXCR2/IL-8 RB, IRS- 1, CXCL8/IL-8, Islet-1, IL-9, CXCL11/1-TAC, IL-9 R, Jagged 1, JAM-4/IGSF5, Jagged
 2, JNK, JAM-A, JNK1/JNK2, JAM-B/VE-JAM, JNK1, JAM-C, JNK2, Kininogen, Kalicreina 3/PSA, Kininostatina,
 Kalicreina 4, KIR/CD158, Kalicreina 5, KIR2DL1, Kalicreina 6/Neurosin, KIR2DL3, Kalicreina 7, KIR2DL4/CD158d,
 Kalicreina 8/Neurosin, KIR2DS4, Kalicreina 9, KIR3DL1, Plasma /KLB1, KIR3DL2, Kalicreina 10, Kirrel2,
 Kalicreina Kalicreina 11, KLF4, Kalicreina 12, KLF5, Kalicreina 13, KLF6, Kalicreina 14, Klotho, Kalicreina 15, Klotho
 beta, KC, KOR, Keap1, Kremen-1, Kell, Kremen-2, KGF/FGF-7, LAG-3, LINGO-2, LAIR1, Lipin 2, LAIR2, Lipocalina-
 1, Laminina alfa 4, Lipocalina-2/NGAL, Laminina gamma 1,5-Lipopigénhasa, Laminina I, LXR alfa/NR1H3, Laminina
 15 S, LXR beta/NR1H2, Laminina-1, Livina, Laminin-5, LIX, LAMP, LMIR1/CD300A, Langerina, LMIR2/CD300c, LAR,
 LMIR3/CD300LF, Latexina, LMIRS/CD300LB, Layilina, LMIR6/CD300LE, LBP, LMO2, LDL R, LOX-1/SR-E1, LECT2,
 LRH-1/NR5A2, LEDGF, LRIG1, Lefty, LRIG3, Lefty-1, LRP-1, Lefty-A, LRP-6, Legumaina, LSECTin/CLEC4G,
 Leptina, Lumican, Leptin R, CXCL15/Lungquina, Leucotrieno B4, XCL1/Limfotactina, Leucotrieno B4 R1, Linfotoxina,
 20 LIF, Linfotoxina beta/TNFSF3, LIF R alfa, Linfotoxina beta R/TNFRSF3, LIGHT/TNFSF14, Lyn, Limitina, Lyp,
 LIMP2/SR-B2, Homólogo de Lisil Oxidasa 2, LIN-28, LYVE-1, LINGO-1, alfa 2-Macroglobulina, CXCL9/MIG,
 MAD2L1, Mimecan, MAdCAM-1, Mindina, MafB, Mineralocorticoide R/NR3C2, Maff, CCL3L1/MIP-1 alfa Isoforma
 LD78 beta, MafG, CCL3/MIP-1 alfa, MafK, CCL4L1/LAG-1, MAG/Siglec-4-a, CCL4/MIP- 1 beta, MANF, CCL15/MIP-
 1 delta, MAP2, CCL9/10/MIP-1 gamma, MAPK, MIP-2, Marapsina/Pancreasina, CCL19/MIP- 3 beta, MARCKS,
 25 CCL20/MIP-3 alfa, MARCO, MIP-I, Mash1, MIP-II, Matrilin-2, MIP-III, Matrilin-3, MIS/AMH, Matrilin- 4, MIS R11,
 Matriptasa/ST14, MIXL1, MBL, MKK3/MKK6, MBL-2, MKK3, Melanocortina 3R/MC3R, MKK4, MCAM/CD146, MKK6,
 MCK-2, MKK7, Mc1-1, MKP-3, MCP-6, MLH-1, CCL2/MCP-1, MLK4 alfa, MCP-11, MMP, CCL8/MCP-2, MMP- 1,
 CCL7/MCP-3/MARC, MMP-2, CCL13/MCP-4, MMP-3, CCL12/MCP-5, MMP-7, M-CSF, MMP-8, M-CSF R, MMP-9,
 MCV-type II, MMP-10, MD-1, MMP-11, MD-2, MMP-12, CCL22/MDC, MMP-13, MDL-1/CLECSA, MMP-14, MDM2,
 30 MMP-15, MEA-1, MMP-16/MT3-MMP MEK1/MEK2, MMP-24/MT5-MMP, MEK1, MMP-25/MT6-MMP, MEK2, MMP-
 26, Melusina, MMR, MEPE, MOG, Meprin alfa, CCL23/MPIF-1, Meprin beta, M-Ras/R-Ras3, Mer, Mrell, Mesotelina,
 MRP1 Meteorina, MSK1/MSK2, Metionina Aminopeptidasa 1, MSK1, Metionina Aminopeptidasa, MSK2, Metionina
 Aminopeptidasa 2, MSP, MFG-E8, MSP R/Ron, MFRP, Mug, MgcRacGAP, MULT-1, MGL2, Musashi-1, MGMT,
 Musashi-2, MIA, MuSK, MICA, MutY ADN Glucosilasa, MICB, MyD88, MICL/CLEC12A, Mieloperoxidasa, beta 2
 35 Microglobulina, Miocardina, Midkina, Miocilina, MIF, Mioglobina, NAIP NGFI-B gamma/NR4A3, Nanog,
 NgR2/NgRH1, CXCL7/NAP-2, NgR3/NgRH2, Nbs1, Nidogen-1/Entactina, NCAM-1/CD56, Nidogen-2, NCAM-L1,
 Óxido Nítrico, Nectin-1, Nitrotirosina, Nectin-2/CD112, NKG2A, Nectina-3, NKG2C, Nectina-4, NKG2D, Neogenina,
 NKp30, Neprilisin/CD10, NKp44, Neprilisin- 2/MMEL1/MMEL2, NKp46/NCR1, Nestina, NKp80/KLRF1, NETO2,
 NKX2.5, Netrina-1, NMDA R, Subunidad NR1, Netrina-2, NMDA R, Subunidad NR2A, Netrina-4, NMDA R,
 40 Subunidad NR2B, Netrina-Gla, NMDA R, Subunidad NR2C, Netrina-G2a, N-Me- 6,7-diOH-TIQ, Neuregulina-
 1/NRG1, Nodal, Neuregulina-3/NRG3, Noggina, Neuritina, Receptor Nogo, NeuroD1, Nogo-A, Neurofascina, NOMO,
 Neurogenina-1, Nope, Neurogenina-2, Norrina, Neurogenina-3, eNOS, Neurolisina, iNOS, Neurofina II, nNOS,
 Neuropilina-1, Notch-1, Neuropilina-2, Notch-2, Neuropoietina, Notch-3, Neurotrimina, Notch-4, Neurturina,
 NOV/CCN3, NFAM1, NRAGE, NF-H, NrCAM, NFkB1, NRL, NFkB2, NT-3, NF-L, NT-4, NF-M, NTB-A/SLAMF6,
 45 NG2/MCSP, NTH1, NGF R/TNFRSF16, Nucleostemina, beta-NGF, Nurr-1/NR4A2, NGFI-B alfa/NR4A1, OAS2,
 Orexin B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/Periostina, OCIL/CLEC2d, Oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC21,
 OSM R beta, Oct-3/4, Osteoactivina/GPNMB, OGG1, Osteoadherina, Olig 1, 2, 3, Osteocalcina, Olig1, Osteocrina,
 Olig2, Osteopontina, Olig3, Osteoprotegerina/ TNFRSF11B, Marcador de Oligodendrocito 01, Otx2, Marcador de
 Oligodendrocito 04, OV-6, OMgp, OX40/TNFRSF4, Opticina, OX40 Ligando/TNFSF4, Orexin A, OAS2, Orexin B,
 50 OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/Periostina, OCIL/CLEC2d, Oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC21, OSM R beta,
 Oct-3/4, Osteoactivina/GPNMB, OGG1, Osteoadherina, Olig 1, 2, 3, Osteocalcina, Olig1, Osteocrina, Olig2,
 Osteopontina, Olig3, Osteoprotegerina/TNFRSF11B, Marcador de Oligodendrocito 01, Otx2, Marcador de
 Oligodendrocito 04, OV-6, OMgp, OX40/TNFRSF4, Opticina, OX40 Ligando/TNFSF4, Orexin A, RACK1, Ret, Rad1,
 REV-ERB alfa/NR1D1, Rad17, REV-ERB beta/NR1D2, Rad51, Rex-1, Rae-1, RGM-A, Rae- 1 alfa, RGM-B, Rae-1
 55 beta, RGM-C, Rae-1 delta, Rheb, Rae-1 epsilon, Ribosomal Proteína S6, Rae-1 gamma, RIP1, Raf-1, ROBO1,
 RAGE, ROBO2, Ra1A/Ra1B, ROBO3, Ra1A, ROBO4, Ra1B, ROR/NR1F1-3 (pan), RANK/TNFRSF11A, ROR
 alfa/NR1F1, CCL5/RANTES, ROR gamma/NR1F3, Rap1A/B, RTK similar a Receptor de Orfan 1/ROR1, RAR alfa/
 NR1B1, RTK similar a Receptor de Orfan 2/ROR2, RAR beta/NR1B2, RP105, RAR gamma/NR1B3, RPA2, Ras,
 RSK (pan), RBP4, RSK1/RSK2, RECK, RSK1, Reg 2/PAP, RSK2, Reg I, RSK3, Reg II, RSK4, Reg III, R-Spondin 1,
 60 Reg Ma, R-Spondin 2, Reg IV, R-Spondin 3, Relaxina-1, RUNX1/CBFA2, Relaxina-2, RUNX2/CBFA1, Relaxina-3,
 RUNX3/CBFA3, RELM alfa, RXR alfa/NR2B1, RELM beta, RXR beta/NR2B2, RELT/TNFRSF19L, RXR
 gama/NR2B3, Resistina, S100A10, SLITRK5, S100A8, SLP1, S100A9, SMAC/Diablo, S100B, Smad1, STOOP,
 Smad2, SALL1, Smad3, delta-Sarcoglycan, Smad4, Sca-1/Ly6, Smad5, SCD-1, Smad7, SCF, Smad8, SCLF R/c-kit,
 SMC1, SCGF, alfa- Actina de músculo lisa, SCL/Tall, SMUG1, SCP3/SYCP3, Caracol, CXCL12/SDF-1,
 65 Intercambiador de Sodio Calcio 1, SDNSF/MCFD2, Soggy-1, alfa-Secretasa, Erizo Sonic, gamma-Secretasa, S o
 CS1, beta-Secretasa, S o CS3, E-Selectina, Sortilina, L-Selectina, SOST, P-Selectina, SOX1, Semaforina 3A, SOX2,

Semaforina 3C, SOX3, Semaforina 3E, SOX7, Semaforina 3F, SOX9, Semaforina 6A, SOX10, Semaforina 6B, SOX17, Semaforina 6C, SOX21 Semaforina 6D, SPARC, Semaforina 7A, SPARC similar a 1, Separass, SP-D, Serina/Sustrato de Treonina Sustrato de Fosfatasa I, Spinesina, Serpina A1, F-Spondina, Serpina A3, SR-AI/MSR, Serpina A4/Kallistatina, Src, Serpina A5/Inhibidor de Proteína C, SREC-I/SR-F1, Serpina A8/Angiotensinogeno, SREC-II, Serpina B5, SSEA-1, Serpina C1/Antitrombina-III, SSEA-3, Serpina D1/Heparin Cofactor II, SSEA-4, Serpina E1/PAI-1, ST7/LRP12, Serpina E2, Stabilina-1, Serpina F1, Stabilina-2, Serpina F2, Stanniocalcina 1, Inhibidor de Serpina G1/C1, Stanniocalcina 2, Serpina 12, STAT1, Amiloide A1 en suero, STAT2, SF-1/NR5A1, STAT3, SGK, STAT4, SHBG, STAT5a/b, SHIP, STAT5a, SHP/NROB2, STAT5b, SHP-1, STAT6, SHP-2, VE-Statina, SIGIRR, Stella/Dppa3, Siglec-2/CD22, STRO-1, Siglec-3/CD33, Sustancia P, Siglec-5, Sulfamidasa/SGSH, Siglec-6, Factor de Modificación de Sulfatasa 1/SUMF1, Siglec-7, Factor de Modificación de Sulfatasa 2/SUMF2, Siglec-9, SUMO1, Siglec-10, SUMO2/3/4, Siglec-11, SUMO3, Siglec-F, Superóxido de Dismutasa, SIGNR1/CD209, Superóxido de Dismutasa-1/Cu-Zn SOD, SIGNR4, Superóxido de Dismutasa-2/Mn-SOD, SIRP beta 1, Superóxido de Dismutasa-3/EC-SOD, SKI, Survivina, SLAM/CD150, Synapsin I, Transposasa Bella Durmiente, Sindecan-1/CD138, Slit3, Sindecan-2, SLITRK1, Sindecan-3, SLITRK2, Sindecan-4, SLITRK4, TACI/TNFRSF13B, TMEFF1/Tomoregulina-1, TAO2, TMEFF2, TAPP1, TNF-alfa/ TNFSF1A, CCL17/TARC, TNF-beta/TNFSF1B, Tau, TNF R1/TNFRSF1A, TC21/R-Ras2, TNF R11/TNFRSF1B, TCAM-1, TOR, TCCR/WSX-1, TP-1, TG-PTP, TP63/TP73L, TDG, TR, CCL25/TECK, TR alfa/NR1A1, Tenascin C, TR beta 1/NR1A2, Tenascin R, TR2/NR2C1, TER-119, TR4/NR2C2, TERT, TRA-1-85, Testican 1/SPOCK1, TRADD, Testican 2/SPOCK2, TRAF-1, Testican 3/SPOCK3, TRAF-2, TFPI, TRAF-3, TFPI-2, TRAF-4, TGF-alfa, TRAF-6, TGFbeta, TRAIL/TNFSF10, TGF-beta 1, TRAIL R1/TNFRSF10A, LAP (TGF-beta 1), TRAIL R2/TNFRSF10B, Latent TGFbeta 1, TRAIL R3/TNFRSF10C, TGF-beta 1.2, TRAIL R4/TNFRSF10D, TGF-beta 2, TRANCE/TNFSF11, TGF-beta 3, Tfr (Transferrina R), TGF-beta 5, Apo-Transferrina, TGF-beta Latente bp1, Holo-Transferrina, TGF-beta bp2 Latente, Trappina- 2/Elafina, TGF-beta bp4 Latente, TREM-1, TGF-beta RI/ALK-5, TREM-2, TGF-beta RII, TREM-3, TGF-beta RIIB, TREML1/TLT-1, TGF-beta RIII, TRF-1, Termolisina, TRF-2, Tioredoxina-1, TRH-degrading Ectoenzima/TRHDE, Tioredoxina-2, TRIMS, Tioredoxina-80, Tripeptidil-Peptidasa I, Tioredoxina similar a 5/TRP14, TrkA, THOP1, TrkB, Trombomodulina/CD141, TrkC, Trombopoietina, TROP-2, Trombopoietina R, péptido 3 de Troponina I, Trombospondina-1, Troponina T, Trombospondina-2, TROY/TNFRSF19, Trombospondina-4, Tripsina 1, Timopietina, Tripsina 2/PRSS2, timo quimioquinas -1, Tripsina 3/PRSS3, Tie-1, Triptasa-5/Prss32, Tie-2, Triptasa alfa/TPS1, TIM-1/KIM-1/HAVCR, Triptasa beta-1/MCPT-7, TIM-2, Triptasa beta-2/TPSB2, TIM-3, Triptasa epsilon/BSSP-4, TIM-4, Triptasa gamma-1/TPSG1, TIM-5, Triptofano Hidroxilasa, TIM-6, TSC22, TIMP-1, TSG, TIMP-2, TSG-6, TIMP-3, TSK, TIMP-4, TSLP, TL1A/TNFSF15, TSLP R, TLR1, TSP50, TLR2, beta-III Tubulina, TLR3, TWEAK/TNFSF12, TLR4, TWEAK R/TNFRSF12, TLR5, Tyk2, TLR6, Fosfo-Tirosina, TLR9, Tirosina Hidroxilasa, TLX/NR2E1, sustrato de Tirosina Fosfatasa I, Ubiquitina, UNC5H3, Ugi, UNC5H4, UGRP1, UNG, ULBP-1, uPA, ULBP-2, uPAR, ULBP-3, URB, UNC5H1, UVDE, UNC5H2, Vanilloid R1, VEGF R, VASA, VEGF R1/Fit-1, Vasohibina, VEGF R2/KDR/Fik-1, Vasorina, VEGF R3/Fit-4, Vasostatina, Versican, Vav-1, VGSQ, VCAM-1, VHR, VDR/NR111, Vimentina, VEGF, Vitronectina, VEGF-B, VLDLR, VEGFC, vWF-A2, VEGF-D, Sinucleina-alfa, Ku70, WASP, Wnt-7b, WIF-1, Wnt-8a WISP-1/CCN4, Wnt-8b, WNK1, Wnt-9a, Wnt-1, Wnt-9b, Wnt-3a, Wnt-10a, Wnt-4, Wnt-10b, Wnt-5a, Wnt-11, Wnt-5b, wntNS3, Wnt7a, XCR1, XPE/DDB1, XEDAR, XPE/DDB2, Xg, XPF, XIAP, XPG, XPA, XPV, XPD, XRCC1, Yes, YY1, EphA4.

Otros polipéptidos activos divulgados en este documento incluyen: BOTOX, Myobloc, Neurobloc, Dysport (u otros serotipos de neurotoxinas de botulinio), alglucosidasa alfa, daptomicina, YH-16, chriogonadotropina alfa, filgrastim, cetorelix, interleuquina-2, aldesleuquina, teceleuquina, denileuquina difitox, interferón alfa-n3 (inyección), interferón alfa-n1, DL-8234, interferón, Suntory (gamma-1 a), interferón gamma, timosina alfa 1, tasonermina, DigiFab, ViperaTAb, EchiTAb, CroFab, nesiritida, abatacept, alefacept, Rebif, eptoterminalfa, teriparatida (osteoporosis), calcitonina inyectable (enfermedad ósea), calcitonina (nasal, osteoporosis), etanercept, glutámero de hemoglobina 250 (bovina), drotrecogin alfa, colagenasa, carperitida, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (gel tópico, cicatrización de la herida), DWP-401, darbepoetina alfa, epoetina omega, epoetina beta, epoetina alfa, desirudina, lepirudina, bivalirudina, nonacog alfa, Mononina, eptacog alfa (activada), Factor recombinante VIII+VWF, Recombinate, Factor recombinante VIII, Factor VIII (recombinante), Alfanato, octocog alfa, Factor VIII, palifermina, Indiquinasa, tenecteplasa, alteplasa, pamiteplasa, reteplasa, nateplasa, monteplasa, follitropin alfa, rFSH, hpFSH, micafungina, pegfilgrastim, lenograstim, nartograstim, sermorelina, glucagon, exenatida, pramlintida, imiglucerasa, galsulfasa, Leucotropina, molgramostim, acetato de triptorelina, histrelina (implante subcutáneo, Hydron), deslorelina, histrelina, nafarelina, depósito de liberación sostenida de leuprolida (ATRIGEL), implante de leuprolida (DUROS), goserelina, somatropina, Eutropina, KP-102 program, somatropina, somatropina, mecasermina (falta de crecimiento), enfuvirtida, Org-33408, insulina glargina, insulina glulisina, insulina (inhalaada), insulina lispro, insulina detemir, insulina (bucal, RapidMist), rinfabato de mecasermin, anakinra, celmoleuquina, 99 inyección de mTc-apcitida, mielopid, Betaseron, acetato de glatiramer, Gepon, sargamostima, oprelvekina, interfernes alfa derivados de leucocitos humanos, Bilive, insulina (recombinante), insulina humana recombinante, insulina aspart, mecasermina, Roferon-A, interferón-alfa 2, Alfaferona, interferón alfacon-1, interferón alfa, hormona luteinizante humana recombinante de Avonex, dornasa alfa, trafermina, ziconotida, taltirelina, diboterminalfa, atosiban, becaplermina, eptifibatida, Zemaira, CTC-111, Shanvac-B, vacuna HPV (cuadrivalente), NOV-002, octreotida, lanreotida, aneastim, agalsidasa beta, agalsidasa alfa, laronidasa, acetato de cobre prezatide (gel tópico), rasburicasa, ranibizumab, Actimmune, PEGIntron, Tricomina, Hormona luteinizante humana recombinante de Avonex, hormona paratiroidea humana recombinante (PTH) 1-84 (sc, osteoporosis), epoetina delta, antitrombina transgénica III, Granditropina, Vitrasa, insulina recombinante, interferón-alfa (pastilla oblonga oral), GEM-21 S,

vapreotida, idursulfasa, omapatrilat, albumina en suero recombinante, certolizumab pegol, glucarpidasa, inhibidor de la esterasa C1 recombinante humano (angioedema), lanoteplasa, Hormonona de Crecimiento humana recombinante, enfuvirtide (inyección libre de aguja, Biojector 2000), VGV-1, interferón (alfa), lucinactant, aviptadil (inhalaado, enfermedad pulmonar), icatibant, ecallantida, omiganan, Aurograb, acetato de pexiganan, ADI-PEG-20, LDI-200, degarelix, cintredekin besudotox, Favld, MDX-1379, ISAtx-247, liraglutida, teriparatida (osteoporosis), tificogina, AA- 4500, locion de liposoma T4N5, catumaxomab, DWP-413, ART-123, Crisalina, desmoteplasa, amediplasa, corifollitropin alfa, TH-9507, teduglutida, Diamyd, DWP-412, Hormonona de Crecimiento (inyección de liberación sostenida), G-CSF recombinante, insulina (inhalaada, AIR), insulina (inhalaada, Technosphere), insulina (inhalaada, AERX), RGN-303, DiaPep277, interferón beta (infección viral de hepatitis C (HCV)), interferón alfa-n3 (oral), belatacept, parches transdérmicos de insulina, AMG-531, MBP- 8298, Xerecept, opebacan, AIDSvax, GV-1001, LymphoScan, ranpirnasa, Lipoxisan, lusupultida, MP52 (vehículo de beta-tricalciofosfato, regeneración ósea), vacuna de melanoma, sipuleucel-T, CTP-37, Insegia, vitespen, trombina humana (congelada, sangrado quirúrgico), trombina, TransMID, alfimeprasa, Puricasa, terlipressin (intravenosa, síndrome hepatorenal), EUR-1008M, FGF-1 recombinante (enfermedad, vascular inyectable), BDM-E, rotigaptida, ETC-216, P-113, MBI- 594AN, duramicina (inhalaada, fibrosis quística), SCV-07, OPI-45, Endostatina, Angiostatina, ABT-510, Bowman Birk Concentrado Inhibidor, XMP-629, 99 mTc-Hynic-Anexina V, kahalalida F, CTCE-9908, teverelix (liberación extendida), ozarelix, romidepsina, BAY-50-4798, interleuquina-4, PRX-321, Pepscan, iboctadekina, rh lactoferrina, TRU-015, IL-21, ATN-161, cilengitida, Albuferon, Biphasix, IRX-2, interferón omega, PCK-3145, CAP-232, pasireotida, huN901-DM1, de ovario cáncer immunotherapeutic vaccine, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, vacuna contra el melanoma peptídico multiepitopo (MART-1, gp100, tirosinasa), nemifitida, rAAT (inhalaada), rAAT (dermatológica), CGRP (inhalaada, asma), pegsunercept, timosina beta-4, plitidepsina, GTP-200, ramoplanina, GRASPA, OBI-1, AC-100, calcitonina de salmón (oral, eligen), calcitonina (oral, osteoporosis), examorelina, capmorelina, Cardeva, velafermina, 131I-TM-601, KK-220, TP-10, ularitida, depelestat, hematida, Crisalina (tópica), rNAPc2, Factor recombinante VIII (liposomal PEGilada), bFGF, variante de estafiloquinasa recombinante pegilada, V-10153, SonoLysis Prolisa, NeuroVax, CZEN-002, terapia de neogénesis de células de islotes, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, exenatida (liberación controlada, Medisorb), AVE-0010, GA-GCB, avorelina, AOD-9604, acetato de linaclotida, CETi-1, Hemospan, VAL (inyectable), insulina de acción rápida (inyectable, Viadel), insulina intranasal, insulina (inhalaada), insulina (oral, eligen), leptina humana metionil recombinante, inyección subcutánea de pitrakinra, eczema), pitrakinra (polvo seco inhalaado, asma), Multikina, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn10 (enfermedades autoinmunitarias/inflamación), talactoferrina (tópica), rEV-131 (ophtálmica), rEV-131 (enfermedad respiratoria), insulina oral humana recombinante (diabetes), RPI-78M, orelvekina (oral), CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, valategrast, interferón alfa-n3 (tópica), IRX-3, RDP-58, Tauferon, lipasa estimulada por sal biliar, Merispasa, fosfatasa alcalina, EP- 2104R, Melanotan-II, bremelanotida, ATL-104, microplasma humana recombinante, AX-200, SEMAX, ACV-1, Xen-2174, CJC-1008, dinorfina A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, vacuna contra malaria (virusomas, PeviPRO), ALTU-135, vacuna contra parvovirus B 19, vacuna contra influenza (neuraminidasa recombinante), vacuna contra malaria/HSV, vacuna contra ántrax, Vacc- 5q, Vacc-43, H vacuna contra VIH (oral), vacuna contra HPV, Tat Toxoide, YSPSL, CHS-13340, PTH(1-34) crema liposomal (Novasome), Ostabolina-C, análogo de PTH (tópica, psoriasis), vacuna contra MBR1-93.02, MTB72F (tuberculosis), vacuna contra MVA-Ag85A (tuberculosis), FAR-404, BA-210, vacuna contra la peste recombinante F1V, AG-702, OXSODrol, rBetV1, Der-p1/Der-p2/Der-p7 vacuna alergénica (alergia a ácaros del polvo), antígeno péptido PR1 (leucemia), vacuna ras mutante, vacuna de lipopéptido E7 HPV-16, vacuna de laberintina (adenocarcinoma), vacuna CML, vacuna de WT1-péptido (cáncer), IDD-5, CDX- 110, Pentrys, Norelina, CitoFab, P-9808, VT-111, icrocaptida, telbermina (dermatología, úlcera del pie diabético), rupintrivir, reticulosa, rGRF, PIA, alfa-galactosidasa A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, vacuna terapéutica de angiotensina, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (oral, tuberculosis), DRF-7295, ABT-828, ErbB2-specific inmunotoxina (anticáncer), DT3881L-3, TST-10088, PRO-1762, Combotox, péptido de unión de colecistokinina-B/gastrina-receptor, 111In-hEGF, AE- 37, trastuzumab-DM1, Antagonista G, IL-12 (recombinante), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (tópica), radioinmunoterapéuticos a base de L-19 (cáncer), Re-188-P-2045, AMG-386, vacuna de DC/1540/KLH (cáncer), VX-001, AVE-9633, AC-9301, vacuna de NY-ESO-1 (péptidos), péptidos de NA17.A2, vacuna de melanoma (antígeno pulsado terapéutico), vacuna contra el cáncer de próstata, CBP-501, lactoferrina humana recombinante (ojos secos), FX-06, AP-214, WAP-8294A2 (inyectable), ACP-HIP, SUN-11031, péptido YY [3-36] (obesidad, intranasal), FGLL, atacicept, BR3-Fc, BN-003, BA-058, hormona paratiroides human 1-34 (nasal, osteoporosis), F-18-CCR1, AT-1001 (enfermedad celíaca/diabetes), JPD-003, PTH(7-34) crema liposomal (Novasome), duramicina (ophtálmica, ojos secos), CAB-2, CTCE-0214, eritropoietina GlucoPEGilada, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, aminocandina, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, teverelix (liberación inmediata), EP-51216, hGH (liberación controlada, Biosphere), OGP-1, sifuvirtida, TV- 4710, ALG-889, Org-41259, rhCC10, F-991, timopentina (enfermedades pulmonares), r(m)CRP, insulina hepatoselectiva, sub alina, proteína de fusión de L19-IL-2, elafina, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, agonista del receptor de trombopoyetina (trastornos trombocitopenicos), AL-108, AL-208, antagonistas del factor de crecimiento nervioso (dolor), SLV-317, CGX-1007, INNO-105, teriparatida oral (eligen), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, vacuna de fusión de LFn-p24 (Therapore), EP-1043, S. vacuna pediátrica contra S. pneumoniae, vacuna contra la malaria, vacuna contra Neisseria meningitidis Grupo B, vacuna estreptocócica grupo B neonatal, vacuna contra el ántrax, vacuna contra VHC (gpE1 + gpE2 + MF-59), terapia con otitis media, vacuna contra el VHC (antígeno central + ISCOMATRIX), hPTH (1- 34) (transdérmico, ViaDerm), 768974, SYN-101, PGN-0052, avismicina, BIM-23190, vacuna antituberculosa, péptido multiresistente a tirosinasa, vacuna contra el cáncer, enkastim, APC-8024, G1-5005, ACC-001, TTS- CD3, TNF dirigido a vasos sanguíneos (tumores sólidos), desmopresina (liberación controlada bucal), onercept, TP-9201.

De particular interés son las proteínas de fusión del receptor sTNFR2, CTLA4, TACI, LFA, IL-1RI, IL1-Ra, IL-1RAcP, VEGF, GLP-1, exendin-4 ligadas a dominios Fc, que se pueden mejorar al agregar (o reemplazar el ligador existente con) un ligador de polipéptido de dominio de mucina de acuerdo con la invención.

5 Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de numerosas proteínas activas son bien conocidas en la técnica y las descripciones y secuencias están disponibles en bases de datos públicas tales como bases de datos de Chemical Abstracts Services (por ejemplo, el registro CAS), GenBank, GenPept, Entrez Nucleotide, Entrez Protein, The Universal Protein Resource (UniProt) y bases de datos de suscripción como GenSeq (por ejemplo, Derwent).
 10 Las secuencias de polinucleótidos pueden ser una secuencia de polinucleótidos de tipo silvestre que codifica una proteína activa dada (por ejemplo, de longitud completa o madura), o en algunos casos la secuencia puede ser una variante de la secuencia de polinucleótidos de tipo silvestre (por ejemplo, un polinucleótido que codifica la proteína activa de tipo silvestre, en la que la secuencia de ADN del polinucleótido se ha optimizado, por ejemplo, para la expresión en una especie particular, o un polinucleótido que codifica una variante de la proteína de tipo silvestre, tal como un mutante dirigido al sitio o una variante alélica. Dentro de la capacidad del experto en la técnica está utilizar
 15 una secuencia de ADNc de tipo silvestre o consenso o una variante optimizada de codones de una proteína activa para crear construcciones de proteínas de fusión contempladas por la invención utilizando métodos conocidos en la técnica y/o en conjunto con la guía y métodos proporcionados en este documento, y descritos más completamente en los Ejemplos.

20 Propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión

La invención proporciona proteínas de fusión de ciertas proteínas terapéuticas activas con una farmacocinética mejorada en comparación con la proteína terapéutica activa no ligada a un dominio de polipéptido de mucina, que, cuando se utiliza en la dosis óptima determinada para la composición mediante los métodos descritos en este
 25 documento, puede lograr una farmacocinética mejorada en comparación con una dosis comparable de la proteína terapéutica activa no ligada a un polipéptido de dominio de mucina de acuerdo con la invención. Como se utiliza en el presente documento, una "dosis comparable" significa una dosis con un moles/kg equivalente para la proteína terapéutica activa que se administra a un sujeto de una manera comparable. Se entenderá en la técnica que una "dosificación comparable" de la proteína de fusión representaría un mayor peso de agente pero tendría
 30 esencialmente los mismos equivalentes molares de la proteína terapéutica activa en la dosis de la proteína de fusión y/o tendría la misma concentración molar aproximada relativa a la proteína terapéutica activa.

Las propiedades farmacocinéticas que se pueden potenciar al utilizar un ligador de polipéptidos de dominio de mucina de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, vida media, Tmax, Cmax (en este caso, la mejora se refiere a la reducción de diferencias de pico a valle), distribución o duración de la acción mediante una
 35 combinación de los efectos individuales.

Propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas

40 Además de potenciar las propiedades de PK de un agente terapéutico, una proteína de fusión que comprende un ligador de polipéptido de dominio de mucina puede ser útil para mejorar las propiedades farmacéuticas o fisicoquímicas (tales como el grado de solubilidad acuosa) del péptido o proteína terapéuticamente activo. Las mejoras de solubilidad pueden medirse tanto mediante la adición de carbohidratos altamente hidrófilos en la mucina como mediante la selección de la secuencia de polipéptido de mucina apropiada, que puede contener
 45 adicionalmente residuos ionizables tales como ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina y arginina. Los residuos ionizables dan como resultado la modulación del pI de la proteína de fusión y, por lo tanto, la carga total de la proteína en una formulación que se aproxima al pH fisiológico y a la tonicidad.

Las proteínas de fusión de la invención se pueden construir y ensayar, utilizando los métodos descritos en este documento, para confirmar las propiedades fisicoquímicas de la proteína de fusión dando como resultado las propiedades deseadas. El polipéptido de dominio de mucina se puede seleccionar de manera que la proteína de fusión tenga una solubilidad acuosa que sea por lo menos aproximadamente un 25% mayor en comparación con una proteína terapéutica activa no ligada a la proteína de fusión, o por lo menos aproximadamente un 30% o por lo
 50 menos aproximadamente 40%, o por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 75%, o por lo menos aproximadamente 100%, o por lo menos aproximadamente 200%, o por lo menos aproximadamente 300%, o por lo menos aproximadamente 400%, o por lo menos aproximadamente 500 %, o por lo menos aproximadamente 1000% mayor que la proteína activa terapéutica correspondiente que no contiene el ligador de dominio de mucina. Usos de las

60 Proteínas de fusión

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno o afección.

65 Se divulga en este documento un método para lograr un efecto beneficioso en una enfermedad, trastorno o afección mediada por proteína terapéutica activa. La presente invención se dirige a ciertas desventajas y/o limitaciones de las

proteínas terapéuticas activas cuando se fusionan con un socio de fusión de polipéptidos en ausencia de un ligador de polipéptidos de dominio de mucina.

Se divulga en este documento un método para lograr un efecto beneficioso en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una proteína de fusión. La cantidad efectiva puede producir un efecto beneficioso para ayudar a tratar una enfermedad o trastorno. En algunos casos, el método para lograr un efecto beneficioso puede incluir administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de proteína de fusión para tratar un sujeto para enfermedades y categorías de enfermedad en las que no existe una proteína o péptido terapéutico.

Las enfermedades susceptibles de tratamiento por administración de las composiciones de la invención incluyen, sin limitación, cáncer, enfermedades inflamatorias, artritis, osteoporosis, infecciones en particular hepatitis, infecciones bacterianas, infecciones virales, enfermedades genéticas, enfermedades pulmonares, diabetes, enfermedades relacionadas con hormonas, Enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardíacas, infarto de miocardio, trombosis de vena profunda, enfermedades del sistema circulatorio, hipertensión, hipotensión, alergias, alivio del dolor, enanismo y otros trastornos del crecimiento, intoxicaciones, enfermedades de coagulación de sangre, enfermedades del sistema inmune innato, embolia, curación de heridas, curación de quemaduras, enfermedad de Crohn, asma, úlcera, sepsis, glaucoma, isquemia cerebrovascular, síndrome de dificultad respiratoria, úlceras corneales, enfermedad renal, úlcera del pie diabético, anemia, deficiencia de factor IX, deficiencia de factor VIII, deficiencia del factor VII, mucositis, disfagia, trastorno trombocítico, embolia pulmonar, infertilidad, hipogonadismo, leucopenia, neutropenia, endometriosis, enfermedad de Gaucher, obesidad, enfermedad de almacenamiento de lisosomas, SIDA, síndrome premenstrual, síndrome de Turners, caquexia, distrofia muscular, enfermedad de Huntington, colitis, SARS, sarcoma de Kaposi, tumor hepático, tumor de mama, glioma, linfoma no Hodgkin, leucemia mielocítica crónica; Leucemia de células pilosas; Carcinoma de células renales; Tumor de hígado; Linfoma; Melanoma, esclerosis múltiple, sarcoma de Kaposi, virus del papiloma, enfisema, bronquitis, enfermedad periodontal, demencia, parto, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumor de páncreas, tumor de próstata, acromegalia, psoriasis, tumor de ovario, enfermedad de Fabry, enfermedad de almacenamiento de lisosomas.

Se divulga en este documento un método que comprende administrar una proteína de fusión de acuerdo con la invención que comprende un ligador de polipéptido de dominio de mucina y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para un sujeto que lo necesita que da como resultado una mejora mayor en por lo menos un parámetro, condición fisiológica, o resultado clínico mediado por la proteína de fusión en comparación con el efecto mediado por la administración de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión en ausencia de un ligador de polipéptido de dominio de mucina administrado a una dosis comparable. La composición farmacéutica se puede administrar a una dosis terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica se puede administrar utilizando múltiples dosis simultáneas o secuenciales utilizando un régimen de dosificación terapéuticamente efectiva (como se define en el presente documento) para la duración del período de dosificación.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos contrarrestan cualquier efecto tóxico o perjudicial de la proteína de fusión. Una cantidad profilácticamente efectiva se refiere a una cantidad de proteína de fusión requerida durante el período de tiempo necesario para lograr el resultado profiláctico deseado.

Se divulgan en este documento métodos para hacer que las proteínas de fusión den como resultado una estabilidad aumentada, una solubilidad en agua aumentada, y/o facilidad de formulación, en comparación con las proteínas terapéuticas activas nativas. Se divulga en este documento un método para aumentar la solubilidad acuosa de una proteína de fusión en comparación con una proteína de fusión que no comprende un ligador de polipéptido de dominio de mucina. Los factores que contribuyen a la propiedad del ligador de polipéptidos del dominio de mucina para conferir una mayor solubilidad en agua a una proteína de fusión incluyen el alto porcentaje de glucosilación, el tipo de glucanos y la carga sobre los aminoácidos del polipéptido del dominio de mucina. El método puede dar como resultado una proteína de fusión donde la solubilidad en agua es por lo menos aproximadamente 50%, o por lo menos aproximadamente 60% mayor, o por lo menos aproximadamente 70% mayor, o por lo menos aproximadamente 80% mayor, o por lo menos aproximadamente 90% mayor, o por lo menos aproximadamente 100% mayor, o por lo menos aproximadamente 150% mayor, o por lo menos aproximadamente 200% mayor, o por lo menos aproximadamente 400% mayor, o por lo menos aproximadamente 600% mayor, o por lo menos aproximadamente 800% mayor, o por lo menos aproximadamente 1000% mayor, o por lo menos aproximadamente 2000% mayor, o por lo menos aproximadamente 4000% mayor, o por lo menos aproximadamente 6000% mayor en condiciones fisiológicas, o en una formulación terapéuticamente aceptable, en comparación con la proteína terapéutica activa nativa.

Secuencias de ácidos nucleicos

La presente invención proporciona ácidos polinucleicos aislados que codifican proteínas de fusión y secuencias complementarias a moléculas de ácido polinucleico que codifican proteínas de fusión de la invención. Se divulgan en

este documento métodos para producir ácidos polinucleicos que codifican proteínas de fusión de la invención y secuencias complementarias a proteínas de fusión de la invención, que incluyen variantes homólogas. En general, la divulgación proporciona métodos para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de fusión y expresar el producto génico resultante incluyen ensamblar nucleótidos que codifican cada uno de los polipéptidos del dominio de mucina y proteínas activas, unir los componentes en el marco, incorporar el gen codificador en un vector de expresión apropiado, transformar una célula anfitriona apropiada con el vector de expresión, y hacer que la proteína de fusión se exprese en la célula anfitriona transformada, produciendo de ese modo la proteína de fusión de la invención. Se pueden utilizar técnicas recombinantes estándar en biología molecular para preparar los polinucleótidos y vectores de expresión de la presente invención. De acuerdo con la invención, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión se pueden utilizar para generar moléculas de ADN recombinante que dirigen la expresión de proteínas de fusión en células anfitrionas apropiadas. Se prevén varias estrategias de clonación para que sean adecuadas para realizar la presente invención, muchas de las cuales se pueden utilizar para generar una construcción que comprende un gen que codifica una proteína de fusión o su complemento. En una realización, la estrategia de clonación se utilizaría para crear un gen que codifica una proteína de fusión monomérica que comprende una proteína activa y un polipéptido de dominio de mucina. En las realizaciones anteriores descritas anteriormente en este párrafo, el gen puede comprender adicionalmente nucleótidos que codifican secuencias separadoras que también pueden codificar la(s) secuencia(s) de división.

En un enfoque, se construye primero una construcción que contiene la secuencia de ADN correspondiente a una proteína de fusión. El ADN que codifica una proteína activa y/o un dominio de polipéptido de mucina se puede obtener a partir de una colección de ADNc preparada utilizando métodos estándar de tejido o células aisladas que se cree que poseen el ARNm de una proteína activa y expresarlo a un nivel detectable. Si es necesario, la secuencia codificante puede obtenerse utilizando procedimientos de extensión de cebador convencionales como se describe en Sambrook, et al., *Supra*, para detectar precursores y procesar intermedios de ARNm que pueden no haber sido transcritos de forma inversa en ADNc. De acuerdo con lo anterior, el ADN se puede obtener convenientemente a partir de una colección de ADNc preparada a partir de tales fuentes. El(los) gen(es) codificador(es) también se pueden obtener de una colección genómica o crearse por procedimientos sintéticos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, síntesis automática de ácidos nucleicos) utilizando secuencias de ADN obtenidas de bases de datos, patentes o referencias bibliográficas disponibles públicamente. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica y están bien descritos en la literatura científica y de patentes. Por ejemplo, se pueden obtener secuencias de Números de Registro de Chemical Abstracts Services (CAS) (publicados por American Chemical Society) y/o Números de Acceso GenBank disponibles a través de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponible en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov que corresponden a las entradas en el Registro CAS o la base de datos GenBank que contienen una secuencia de aminoácidos de la proteína activa o de un fragmento o variante de la proteína activa o del polipéptido del dominio de mucina.

Un gen o polinucleótido que codifica uno o ambos de los socios de fusión de polipéptidos se puede clonar a continuación en una construcción, que puede ser un plásmido u otro vector bajo control de secuencias de transcripción y traducción apropiadas para la expresión de proteínas de alto nivel en un sistema biológico. En una etapa posterior, un segundo gen o polinucleótido que codifica el ligador de polipéptidos del dominio de mucina, por ejemplo, está genéticamente fusionado a los nucleótidos que codifican el extremo N y/o C de los socios de fusión del polipéptido al clonarlo en la construcción adyacente y en nucleótidos marco que codifican los socios de fusión.

Los polinucleótidos resultantes que codifican las proteínas de fusión luego se pueden clonar individualmente en un vector de expresión. La secuencia de ácido nucleico puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un(os) sitio(s) de endonucleasas de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el arte. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar que son conocidas por los expertos en la técnica. Dichas técnicas son bien conocidas en el arte y están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes.

Los vectores, anfitriones y sistemas de expresión adecuados son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica de la expresión recombinante. Varios vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células anfitrionas seleccionadas, y además permite la expresión y la modificación postraduccional de la proteína recombinante dentro de la célula anfitriona.

La presente invención también proporciona una célula anfitriona para expresar las composiciones de proteínas de fusión monoméricas descritas en este documento. Los ejemplos de células anfitrionas eucariotas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, anfitriones de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*; anfitriones de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* Sf9, *Spodoptera frugiperda* Sf21, y células High Five; y anfitriones de mamíferos tales como células de fibroblastos de ratón (C 127-BPV), células de ovario de hámster chino (CHO-DHFR, CHO-NEOSPLA, CHO-GS) y células de mieloma de ratón (NSO-GS).

Las proteínas de fusión expresadas se pueden purificar a través de métodos conocidos en la técnica o mediante métodos divulgados en el presente documento. Se pueden utilizar procedimientos tales como filtración en gel, purificación por afinidad, fraccionamiento de sal, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción de hidroxiapatita, cromatografía de interacción hidrófoba y electroforesis en gel; cada uno adaptado para recuperar y purificar la proteína de fusión producida por las respectivas células huésped. Los métodos de purificación se describen en Robert K. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Charles R. Castor (ed.), Springer-Verlag 1994, y Sambrook, et al., *Supra*. Las separaciones de purificación en varias etapas también se describen en Baron, et al., *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 179-90 (1990) y Below, y col., *J. Chromatogr. A.* 679: 67-83 (1994).

Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión de la invención y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo que el polipéptido se combina con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable, tal como soluciones o tampones acuosos, suspensiones y emulsiones farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de solventes no acuosos incluyen propiltilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento al mezclar el ingrediente activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales, como se describe en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral, intranasal, parenteral o mediante terapia de inhalación, y pueden tomar la forma de tabletas, pastillas, gránulos, cápsulas, píldoras, ampollas, supositorios o forma de aerosol. También pueden tomar la forma de suspensiones, soluciones y emulsiones del ingrediente activo en diluyentes acuosos o no acuosos, jarabes, granulados o polvos. Además, las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros compuestos farmacéuticamente activos o una pluralidad de compuestos de la invención.

Más particularmente, las presentes composiciones farmacéuticas se pueden administrar para terapia por cualquier ruta adecuada que incluyen oral, rectal, nasal, tópica (que incluyen transdérmica, en aerosol, bucal y sublingual), vaginal, parenteral (que incluye subcutánea, subcutánea o intratecal mediante infusión bomba, intramuscular, intravenosa e intradérmica), intravítrea y pulmonar. También se apreciará que la ruta preferida variará con el agente terapéutico, el estado y la edad del receptor, y la enfermedad que se va a tratar.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede administrar con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de tal manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En esta realización, la composición se puede suministrar como un polvo liofilizado para reconstituir antes de la administración. La composición también se puede suministrar en forma líquida, que se puede administrar directamente a un paciente. En una realización, la composición se suministra como un líquido en una jeringa precargada de manera que un paciente se puede autoadministrar fácilmente la composición.

En otra realización, las composiciones de la presente invención se encapsulan en liposomas, que han demostrado utilidad en el suministro de agentes activos beneficiosos de una manera controlada durante periodos de tiempo prolongados. Los liposomas son membranas bicapa cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas también pueden ser vesículas unilaminares que poseen una sola membrana bicapa o vesículas multilaminares con múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa. La estructura de la bicapa de membrana resultante es tal que las colas hidrófobas (no polares) del lípido están orientadas hacia el centro de la bicapa, mientras que las cabezas hidrófilas (polares) se orientan hacia la fase acuosa. En una realización, el liposoma puede estar recubierto con un polímero flexible soluble en agua que evita la absorción por los órganos del sistema de fagocitos mononucleares, principalmente el hígado y el bazo. Los polímeros hidrófilos adecuados para rodear los liposomas incluyen, sin limitación, PEG, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato, polihidroxetilacrilato, hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, polietilenglicol, poliaspartamida y secuencias de péptidos hidrófilos como se describe en las patentes de los Estados Unidos. Nos. 6,316,024; 6,126,966; 6,056,973 y 6,043,094.

Los liposomas pueden estar compuestos por cualquier lípido o combinación de lípidos conocida en la técnica. Por ejemplo, los lípidos formadores de vesículas pueden ser lípidos sintéticos o de origen natural, que incluyen fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y esfingomielina como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,056,973 y 5,874,104. Los lípidos formadores de vesículas también pueden ser glicolípidos, cerebrósidos o lípidos catiónicos, tales como 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamino)propano (DOTAP); bromuro de N-[1-(2,3,-ditetradeciloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE); bromuro de N-[1-(2,3-dioleyloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DORIE); cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); 3[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol); o dimetildiioctadecilamonio (DDAB) también como se divulga en la patente de los Estados Unidos No. 6,056,973. El colesterol también puede estar presente en el rango apropiado para impartir estabilidad a la vesícula como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5,916,588 y 5,874,104.

Para formulaciones líquidas, una propiedad deseada es que la formulación se suministre en una forma que pueda pasar a través de una aguja de calibre 25, 28, 30, 31, 32 para administración intravenosa, intramuscular, intraarticular o subcutánea.

En otras realizaciones, la composición se puede suministrar por las rutas intranasal, bucal o sublingual al cerebro para permitir la transferencia de los agentes activos a través de los conductos olfativos hacia el SNC y reducir la administración sistémica. Los dispositivos comúnmente utilizados para esta ruta de administración se incluyen en la patente de los Estados Unidos No. 6,715,485. Las composiciones suministradas a través de esta ruta pueden permitir una mayor dosificación al SNC o una carga corporal total reducida, lo que reduce los riesgos de toxicidad sistémica asociados con ciertos fármacos. La preparación de una composición farmacéutica para suministro en un dispositivo subdérmico implantable se puede realizar utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como aquellos descritos en, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 3,992,518; 5,660,848; y 5,756,115.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no deben interpretarse como limitativos de la invención tal como se reivindica de cualquier manera.

Ejemplo 1. Actividad de la proteína de fusión IL-1Ra-mucina-Fc in vitro

Se prepararon proteínas de fusión de IL-1Ra humana con el dominio Fc de IgG1 en el que el IL-1Ra se ligó directamente a través de la bisagra de IgG1 (RDB1800) (SEQ ID No.: 1) o en el que se insertaron repeticiones en tándem de MUC20 humana entre el dominio Fc e IL-1Ra (RDB1819) (SEQ ID NO: 2). Los genes se sintetizaron sintéticamente (Geneart) y se clonaron en pcDNA™ (Invitrogen), luego se expresaron transitoriamente en células CHO-S utilizando FreeStyle™ MAX Reagent (Life Technologies). Las proteínas se purificaron utilizando Proteína A (GE Healthcare) y se dializaron frente a PBS.

Las células IL-1β HEK-Blue™ (InvivoGen) son células de riñón embrionario humano diseñadas específicamente para detectar IL-1β bioactivo in vitro al monitorizar la activación inducida por IL-1β de las rutas NF-κB/AP-1. La estirpe celular expresa un gen reportero de fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible (SEAP) bajo el control del promotor de IFN-β mínimo fusionado a cinco sitios de unión a NFκB y cinco a AP-1. Para el ensayo del antagonista de IL-1β, se sembraron células IL-1β HEK-Blue a 50.000 células/pozo en medio DMEM que contenía L-glu 2 mM y FBS inactivado por calor al 10% (Gibco) e IL-1β 57 pM (R&D systems). Las células se incubaron durante 20 horas a 37 °C, CO₂ al 5% con concentraciones variables de IL-1Ra, RDB1800 o RDB1819. La producción de SEAP se detectó al agregar QUANTI-Blue™ (InvivoGen) e incubar durante 3 horas a 37 °C, CO₂ al 5% y luego leer en un lector de placas a 630 nm.

La activación de IL-1β del gen SEAP se puede inhibir por el antagonista IL-1Ra de IL-1β de una manera dependiente de dosis. La pérdida de actividad se observó para IL-1Ra cuando se fusionó directamente a Fc (RDB1800). La incorporación del dominio de mucina entre IL-1Ra y Fc restaura parcialmente la actividad inhibitoria de la molécula de fusión IL-1Ra Fc desde una IC₅₀ de 98 nM durante 1800, a 23 nM para RDB1819 (figura 2).

Ejemplo 2. Medida de peso molecular

La adición de la secuencia de mucinas probablemente lleva a un gran aumento en la O-glicosilación y, por lo tanto, a un volumen hidrodinámico mayor. RDB1800 y RDB1819 se caracterizaron por filtración analítica en gel en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). La columna se equilibró a 0.5 ml/min con PBS, pH 7.4 como un tampón de ejecución para todos los análisis. Después del equilibrio, se inyectaron estándares de peso molecular de proteína (kit de calibración Gel HMW de filtración, GE Healthcare) a una tasa de flujo de 0.5 ml/min para determinar el volumen de elución para generar una curva patrón de peso molecular. A continuación, se inyectaron muestras purificadas de RDB1800 y RDB1819 en series separadas a 0.5 ml/min para determinar el volumen de elución. Los pesos moleculares aparentes de RDB1800 y RDB1819 se determinaron por interpolación utilizando la curva estándar generada a partir de los volúmenes de elución de los diferentes estándares de peso molecular.

Se observó el peso molecular aparente de RDB1800 y RDB1819 mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Existe un total de 4 sitios de glucosilación ligados a N presentes en RDB1800 y 1819, uno en cada brazo de IL-1Ra y uno en cada porción de Fc de la molécula. El peso molecular calculado para RDB1800 es de 85.4 kDa con un tamaño observado de 117 kDa. Esta observación es consistente con la presencia de N-glucosilación y la bisagra flexible que conecta IL1Ra y Fc. La adición del ligador de mucina agrega múltiples sitios de glucosilación ligados a O y una región de bisagra más rígida similar a una barra que da como resultado un tamaño observado de 224 kDa en comparación con un peso molecular calculado de 95 kDa para RDB1819 (figura 3).

Ejemplo 3. Actividad de la proteína de fusión IL-1Ra-mucina-Fc in vivo

La artritis inducida por anticuerpo de colágeno (CAIA) es un modelo de ratón de artritis reumatoide (AR) que se sabe que implica la ruta de IL-1. La artritis se estimuló el Día "-3" mediante administración de un cóctel de anticuerpos monoclonales que están dirigidos a epítopos autoantigénicos conservados en colágeno tipo II. En el Día "0" se administró un refuerzo de endotoxina LPS, junto con inyecciones subcutáneas (SC) únicas de 20 mg/kg de RDB1800 o RDB1819. Se utilizó un grupo de diez ratones para cada tratamiento. El desplazamiento del volumen de la pata del ratón se midió a lo largo de múltiples días para evaluar el grado de inflamación de la pata.

RDB1800 y RDB1819 redujeron significativamente el edema de la pata durante hasta 10 días y 14 días después de la inyección, respectivamente, en comparación con el grupo de control de solución salina. Adicionalmente, la mayor potencia observada en el bioensayo de HEK in vitro se correlaciona con un aumento de la potencia en el modelo de CAIA in vivo con RDB1819 que muestra una diferencia estadísticamente significativa en la reducción de la pata en comparación con RDB1800 (figura 4).

Ejemplo de referencia 1. Inhibición de la diferenciación dependiente de IL-6 de células M1 mediante la construcción de fusión gp130-mucina-Fc.

Las proteínas de fusión que comprenden un gp130 humano truncado que comprende los dominios D1-D3 y el dominio Fc de IgG1 se formaron como dominios de mucina +/- (RDB 1601, SEQ ID NO: 3 y RDB1613 SEQ ID NO: 4). Los genes se sintetizaron sintéticamente (Geneart) y se clonaron en pcDNA™ (Invitrogen) y se expresaron transitoriamente en células CHO-S utilizando FreeStyle™ MAX Reagent (Life Technologies). Las proteínas se purificaron utilizando Proteína A (GE Healthcare) y se dializaron frente a PBS.

Se evaluó la bioactividad in vitro al evaluar la capacidad de RDB1601 y RDB1613 para inhibir la diferenciación dependiente de IL-6 de células M1, medida por el porcentaje de células CD32 positivas después de la exposición a IL-6. Para el ensayo M1, se estimularon 75,000 con 4 ng/mL de IL-6 y 125 ng/mL de IL-6Ra en una mezcla 1: 1 de medio DMEM/MEM que contenía FBS al 10%, 2X NEAA, solución de vitamina 2X (Gibco). La inhibición se probó mediante la adición de concentraciones variables de RDB1601 y RDB1613 y se incubó durante 72 horas a 37 °C, CO₂ al 5%. Después, las células M1 se tiñeron con un anticuerpo CD32-PE anti-ratón (R & D Systems) y se analizaron mediante citometría de flujo.

RDB1601 (construcción de unión no mucina) inhibió la diferenciación dependiente de IL-6 de células M1 de una manera dependiente de la dosis con una IC₅₀ de 20.1 nM, mientras que la construcción RDB1613 que contenía mucina tenía una IC₅₀ de 2.5 nM. (Figura 5). Por lo tanto, RDB1613 es ocho veces más potente que la construcción de ligador no mucina RDB1601.

Ejemplo de referencia 2. Inhibición de la diferenciación dependiente de IL-6 de células M1 mediante la proteína de fusión cpIL-6-gp130D1-mucina-(IgG2)Fc RDB1562 (SEQ ID N°: 19)

Las proteínas de fusión que comprenden una IL-6 permutada circularmente (cpIL-6), el dominio D1 de gp130 humana (gp130D1) y el dominio Fc de IgG2 se expresaron con (RDB1562, SEQ ID NO: 19) y sin (RDB1542, SEQ ID NO: 18) 2 repeticiones en tándem de MUC20 humana insertadas entre el dominio gp130D1 y el dominio Fc. Los genes se sintetizaron (Geneart) y se clonaron en pcDNA™ (Invitrogen) y se expresaron transitoriamente en células CHO-S utilizando FreeStyle™ MAX Reagent (Life Technologies). Las proteínas se purificaron utilizando Proteína A (GE Healthcare) y se dializaron frente a PBS. Se evaluó la bioactividad in vitro al evaluar la capacidad de RDB1542 y RDB1562 para inhibir la diferenciación dependiente de IL-6 de células M1, medida por el porcentaje de células CD32 positivas después de la exposición a IL-6, como se describe en el Ejemplo 4.

Tanto RDB1542 (construcción del ligador no mucina) como RDB1562 (construcción que contiene mucina) inhibieron la diferenciación dependiente de IL-6 de las células M1 de una manera dependiente de la dosis con IC₅₀ de > 1.0 mM y 2.6 nM, respectivamente (Figura 6). Por lo tanto, la inserción del dominio de mucina como un ligador da como resultado una molécula que es > 400 veces más potente que la molécula equivalente sin el ligador de mucina.

Ejemplo 4 Inhibición de la señalización dependiente de IL-1β mediante la proteína de fusión IL-1Ra-mucina-(IgG2)Fc RDB1840 (SEQ ID NO: 21).

Se prepararon proteínas de fusión de IL-1Ra humano con el dominio Fc de IgG2 donde el IL-1Ra se unió directamente a través de la bisagra de IgG2 (RDB1841, SEQ ID NO: 20) o en el que se insertaron 2 repeticiones en tándem de MUC20 humana. entre el dominio Fc e IL-1Ra (RDB1840, SEQ ID NO: 21). Los genes se sintetizaron (Geneart) y se clonaron en pcDNA™ (Invitrogen) y se expresaron transitoriamente en células CHO-S utilizando FreeStyle™ MAX Reagent (Life Technologies). Las proteínas se purificaron utilizando Proteína A (GE Healthcare) y se dializaron frente a PBS. Se evaluó la bioactividad in vitro al evaluar la capacidad de RDB1840 y RDB1841 para inhibir la señalización dependiente de IL-1β en células IL-1β HEK-Blue™ (Invivo-Gen), como se describe en el Ejemplo 1.

Tanto RDB1841 como RDB1840 inhibieron la señalización dependiente de IL-1β de una manera dependiente de la dosis. RDB1840, que contiene el ligador de mucina, inhibió la señalización con una potencia aproximadamente 12 veces mayor (IC₅₀ de 5.0 nM) que RDB1841, carente del ligador de mucina, (IC₅₀ de 63.0 nM) (Figura 7).

La patente y la literatura científica a las que se hace referencia en este documento establecen el conocimiento que está disponible para aquellos expertos en la técnica.

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, se debe entender por aquellos expertos en la técnica que se pueden realizar diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas. También se debe entender que las realizaciones descritas en este documento no son mutuamente excluyentes y que las características de las diversas realizaciones se pueden combinar en su totalidad o en parte de acuerdo con la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

25

<110> ALKERMES, INC.

<120> Polipéptidos de fusión que comprenden ligadores de polipéptido de dominio de mucina

30

<130> 4000.3060 WO

<140>

<141>

35

<150> 61/778,575

<151> 2013-03-13

<150> 61/778,812

<151> 2013-03-13

40

<150> 61/723,081

<151> 2012-11-06

45

<150> 61/657,264

<151> 2012-06-08

<150> 61/657,378

<151> 2012-06-08

50

<150> 61/657,285

<151> 2012-06-08

<160> 23

55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 404

<212> PRT

60

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

65

<400> 1

ES 2 675 784 T3

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

Ala Val Phe Val Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys
 20 25 30

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
 35 40 45

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
 50 55 60

Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe
65 70 75 80

ES 2 675 784 T3

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly
 85 90 95
 Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser
 100 105 110
 Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser
 115 120 125
 Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu
 130 135 140
 Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro
 145 150 155 160
 Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 180 185 190
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 195 200 205
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 210 215 220
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 225 230 235 240
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 245 250 255
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 260 265 270
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 275 280 285
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 290 295 300
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 305 310 315 320
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 325 330 335

ES 2 675 784 T3

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 340 345 350

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 370 375 380

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 385 390 395 400

Ser Pro Gly Lys

<210> 2

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 2

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

Ala Val Phe Val Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys
 20 25 30

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
 35 40 45

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
 50 55 60

Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly
 85 90 95

Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser
 100 105 110

Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser
 115 120 125

ES 2 675 784 T3

Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu
130 135 140

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

Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro
180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser
195 200 205

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

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

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

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

ES 2 675 784 T3

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 3

<211> 545

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 3

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

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

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
100 105 110

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

ES 2 675 784 T3

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
 130 135 140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
 145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
 165 170 175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
 180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
 195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
 210 215 220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys
 245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
 260 265 270

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
 275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
 290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
 305 310 315 320

Thr Thr Gly Gly Gly Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 325 330 335

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 340 345 350

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 355 360 365

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 370 375 380

ES 2 675 784 T3

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
385 390 395 400

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
405 410 415

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
420 425 430

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
435 440 445

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
450 455 460

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
465 470 475 480

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
485 490 495

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
500 505 510

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
515 520 525

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
530 535 540

Lys
545

<210> 4
<211> 601
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 4

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser Pro Glu Ser
20 25 30

ES 2 675 784 T3

Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys Val Leu Lys
 35 40 45

Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr Ile Val Trp
 50 55 60

Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn
 65 70 75 80

Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile
 85 90 95

Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val
 100 105 110

Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys Pro Lys Asn
 115 120 125

Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys Glu Trp Asp
 130 135 140

Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ser Glu
 145 150 155 160

Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg Asp Thr Pro
 165 170 175

Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val Asn Ile Glu
 180 185 190

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

Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro Pro His Asn
 210 215 220

Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu Lys Leu Thr
 225 230 235 240

Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys Tyr Asn Ile
 245 250 255

Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile Pro Pro Glu
 260 265 270

Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp Leu Lys Pro
 275 280 285

ES 2 675 784 T3

Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu Asp Gly Lys
 290 295 300
 Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile Thr Tyr Glu
 305 310 315 320
 Asp Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala
 325 330 335
 Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser
 340 345 350
 Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser
 355 360 365
 Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 370 375 380
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 385 390 395 400
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 405 410 415
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 420 425 430
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 435 440 445
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 450 455 460
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 465 470 475 480
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 485 490 495
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 500 505 510
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 515 520 525
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 530 535 540

ES 2 675 784 T3

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
545 550 555 560

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
565 570 575

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
580 585 590

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
595 600

<210> 5
<211> 20
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
1 5 10 15

Pro Asp Thr Arg
20

10
<210> 6
<211> 23
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ile Thr Thr Thr Thr Thr Val Thr Pro Thr Pro Thr Pro Thr Gly Thr
1 5 10 15

Gln Thr Pro Thr Thr Thr Pro
20

20
<210> 7
<211> 17
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Thr Thr Thr Glu Thr Thr Ser His Asp Thr Pro Ser Phe Thr Ser
1 5 10 15

Ser

30 <210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 675 784 T3

<400> 8

Ala Thr Pro Leu Pro Val Thr Asp Thr Ser Ser Ala Ser Thr Gly His
 1 5 10 15

5 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 9

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro
 1 5

15 <210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 10

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

Thr Pro Pro Val Leu Thr Thr Thr Ala Thr Thr Pro Thr
 20 25

25 <210> 11
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Thr Thr Ala Ala Pro Pro Thr Pro Ser Ala Thr Thr Gln Ala Pro Pro
 1 5 10 15

30 Ser Ser Ser Ala Pro Pro Glu
 20

<210> 12
 <211> 19
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Glu Ser Thr Thr Val His Ser Ser Pro Gly Ala Thr Gly Thr Ala
 1 5 10 15

40 Leu Phe Pro

<210> 13
 <211> 59
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

ES 2 675 784 T3

<400> 13

Ser Ser Ser Pro Thr Pro Ala Glu Gly Thr Ser Met Pro Thr Ser Thr
1 5 10 15

Tyr Ser Glu Gly Arg Thr Pro Leu Thr Ser Met Pro Val Ser Thr Thr
20 25 30

Leu Val Ala Thr Ser Ala Ile Ser Thr Leu Ser Thr Thr Pro Val Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Pro Val Thr Asn Ser Thr Glu Ala
50 55

5 <210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 14

Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro
1 5 10 15

Ser Arg Ala

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

20 <400> 15

Ala Thr Asn Ser Glu Ser Ser Thr Val Ser Ser Gly Ile Ser Thr
1 5 10 15

25 <210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

30 Val Pro Thr Thr Thr Thr
1 5

35 <210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

40 Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala Thr Glu Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 503
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 18

ES 2 675 784 T3

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

ES 2 675 784 T3

Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr
 225 230 235 240

Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu
 245 250 255

Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser
 260 265 270

Gly Gly Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 275 280 285

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 340 345 350

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 420 425 430

Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 435 440 445

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

ES 2 675 784 T3

465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 19
<211> 547
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 19

Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser
1 5 10 15

Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met Ser
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg
35 40 45

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

Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu
65 70 75 80

Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe
85 90 95

Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe
100 105 110

Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu
130 135 140

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

Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Ser Glu Leu Leu Asp
165 170 175

ES 2 675 784 T3

Pro Cys Gly Tyr Ile Ser Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser
 180 185 190

Asn Phe Thr Ala Val Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe
 195 200 205

His Val Asn Ala Asn Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile
 210 215 220

Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr
 225 230 235 240

Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu
 245 250 255

Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser
 260 265 270

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp
 275 280 285

Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser
 290 295 300

Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ser Glu
 305 310 315 320

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 325 330 335

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 340 345 350

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 355 360 365

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 370 375 380

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
 385 390 395 400

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 405 410 415

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

ES 2 675 784 T3

	420		425		430														
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val				
	435						440					445							
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser				
	450					455					460								
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu				
465					470					475					480				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
				485					490						495				
Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val				
			500					505						510					
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met				
		515					520					525							
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser				
	530					535					540								
Pro	Gly	Lys																	
	545																		

- <210> 20
- 5 <211> 380
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
- <400> 20

ES 2 675 784 T3

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp
1 5 10 15

Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala
20 25 30

Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val
35 40 45

Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys
50 55 60

Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu
65 70 75 80

ES 2 675 784 T3

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

ES 2 675 784 T3

325 330 335

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
340 345 350

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
355 360 365

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 21

<211> 425

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 21

ES 2 675 784 T3

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

ES 2 675 784 T3

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

ES 2 675 784 T3

405

410

415

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420 425

5 <210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(6)
 <223> Qualquer aminoácido

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(9)
 <223> Qualquer aminoácido

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(12)
 <223> Qualquer aminoácido

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Qualquer aminoácido

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(18)
 <223> Qualquer aminoácido

<400> 22

Glu Glu Ser Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Thr Xaa Thr Xaa
 1 5 10 15

35 Xaa Xaa Pro

40 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Val Thr Gly Thr Thr Gly Pro Ser Ala
 1 5 10

45

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que tiene bioactividad mejorada que comprende un primer socio de fusión de polipéptido y un segundo socio de fusión de polipéptido, en la que el primer socio de fusión se liga al segundo socio de fusión mediante un ligador de polipéptido de dominio de mucina, en el que la bioactividad de la proteína de fusión se mejora cuando se compara con la fusión del primer socio de fusión de polipéptido y el segundo socio de fusión de polipéptido en la ausencia del ligador de polipéptido de dominio de mucina, en el que;
- 5 a) el ligador de polipéptido de dominio de mucina comprende todo o una porción de una secuencia de polipéptido de dominio de mucina codificada por un gen MUC seleccionado del grupo que consiste de MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC 16, MUC 17, MUC 19, MUC20, y MUC21 o una variante de la secuencia de polipéptidos de dominio de mucina con por lo menos 90% de identidad de secuencia en el nivel de aminoácido;
- 10 b) el primer socio de fusión se selecciona del grupo que consiste de sTNFR2, CTLA4, TACI, LFA, IL-1RI, IL-1Ra, IL-1RAcP, receptor de VEGF, GLP-1, exendina-4 y una secuencia de aminoácidos homóloga a cualquiera de los anteriores con por lo menos 95% de identidad de secuencia en el nivel de aminoácido; y
- 15 c) el segundo socio de fusión de polipéptido comprende un dominio Fc de inmunoglobulina.
- 20 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que por lo menos uno del primer socio de fusión o el segundo socio de fusión es una proteína activa de longitud completa circularmente permutada, un fragmento circularmente permutado de una proteína activa o una variante de secuencia permutada circularmente de una proteína activa, en el que la proteína permutada circularmente, fragmento o variante de secuencia retiene por lo menos una actividad biológica de la proteína activa nativa.
- 25 3. La proteína de fusión de cualquier reivindicación precedente, en la que el ligador de polipéptido de dominio de mucina comprende por lo menos una secuencia de repetición en tándem que comprende la SEQ ID NO: 14.
- 30 4. La proteína de fusión de cualquier reivindicación precedente en la que el ligador de polipéptido de dominio de mucina comprende entre 1 y 5 repeticiones en tándem.
5. La proteína de fusión de la reivindicación 3, en la que el primer socio de fusión es IL-1RI o una secuencia de aminoácidos homóloga al mismo con por lo menos 95% de identidad de secuencia en el nivel de aminoácido.
- 35 6. La proteína de fusión de la reivindicación 3, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.2 o una secuencia de aminoácidos homóloga a la misma con por lo menos 90% o por lo menos 95% de identidad de secuencia.
- 40 7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, que tiene la secuencia de aminoácidos de residuos 24-452 de la SEQ ID NO.2
8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de cualquier reivindicación precedente.
- 45 9. Un vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, opcionalmente que comprende adicionalmente una secuencia reguladora recombinante ligada operablemente a la secuencia de polinucleótidos.
- 50 10. Una célula anfitriona que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. Un método para aumentar la bioactividad de una proteína de fusión que comprende un primer socio de fusión de polipéptido y un segundo socio de fusión de polipéptido, el método comprende las etapas de:
- 55 a) proporcionar un primer socio de fusión de polipéptido, un segundo socio de fusión de polipéptido y un ligador de polipéptido de dominio de mucina;
- b) ligar el primer socio de fusión de polipéptido al segundo socio de fusión de polipéptido mediante el ligador de polipéptido de dominio de mucina para formar una proteína de fusión que comprende un primer socio de fusión de polipéptido y un segundo socio de fusión de polipéptido en el que el primer socio de fusión se liga al segundo socio de fusión mediante un ligador de polipéptido de dominio de mucina;
- 60 c) medir por lo menos una medida de bioactividad de la proteína de fusión de la etapa (b) con una proteína de fusión que comprende el primer socio de fusión de polipéptido y el segundo socio de fusión de polipéptido en la ausencia del ligador de polipéptido de dominio de mucina; y
- 65

d) determinar que la bioactividad medida de la proteína de fusión de la etapa (b) se mejora cuando se compara con la fusión del primer socio de fusión de polipéptido y el segundo socio de fusión de polipéptido en la ausencia del ligador del polipéptido del dominio mucina; en el que la proteína de fusión creada en la etapa b) comprende la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

5 12. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno o afección.

14. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 13, en la que;

15 a) la enfermedad o trastorno o afección se selecciona de: diabetes tipo 2, hemofilia, neutropenia, anemia, trombocitopenia, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, osteoartritis; y/o

b) la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, vía intramuscular o vía intravenosa.

20

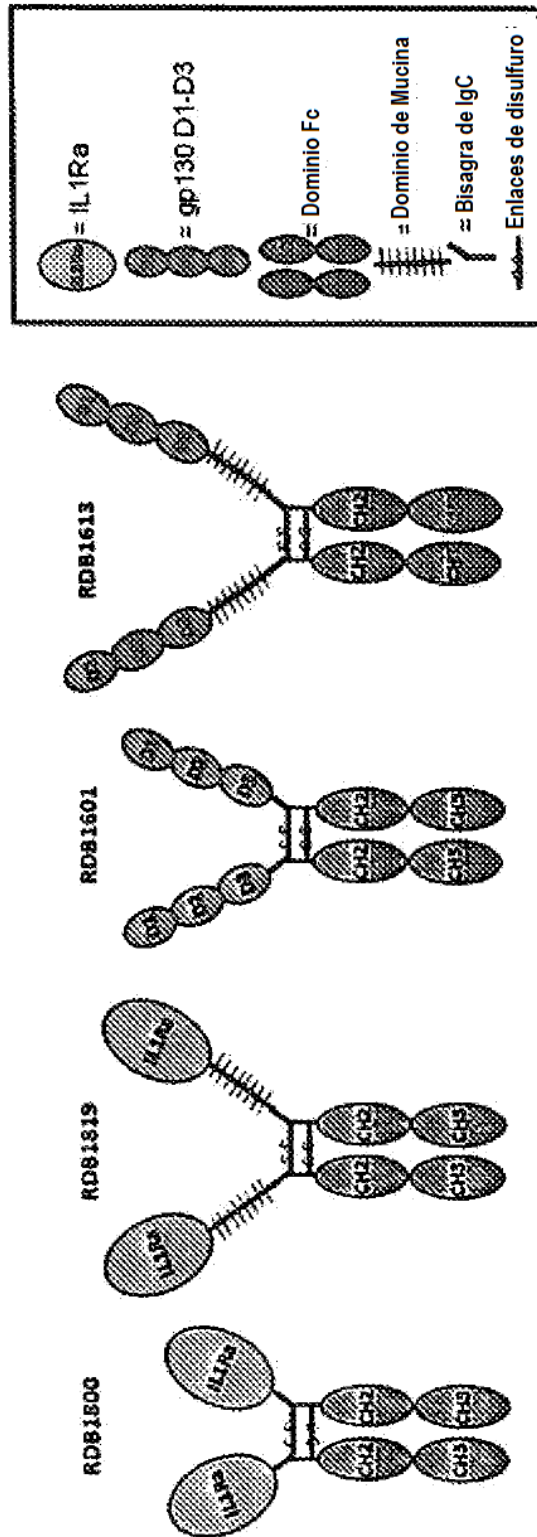


FIG. 1

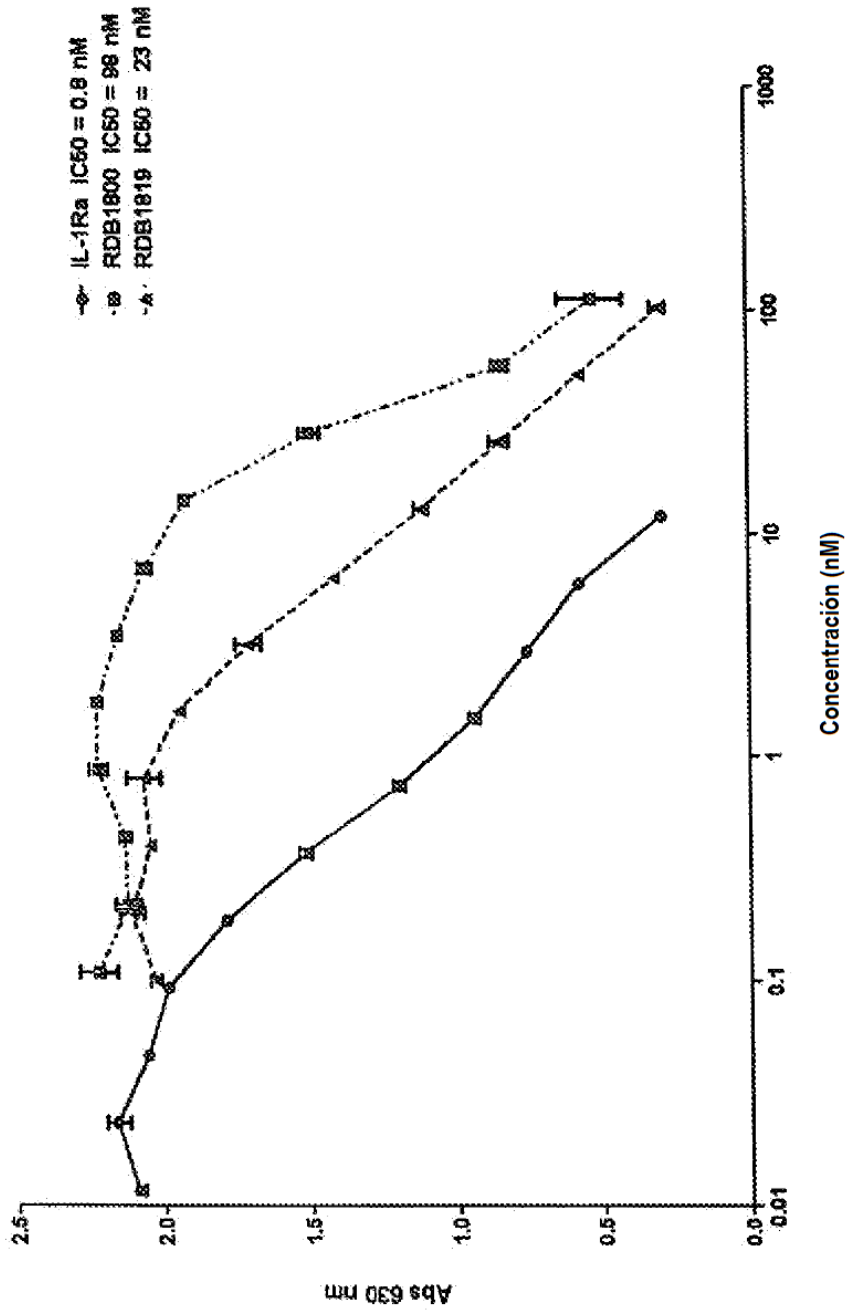


FIG. 2

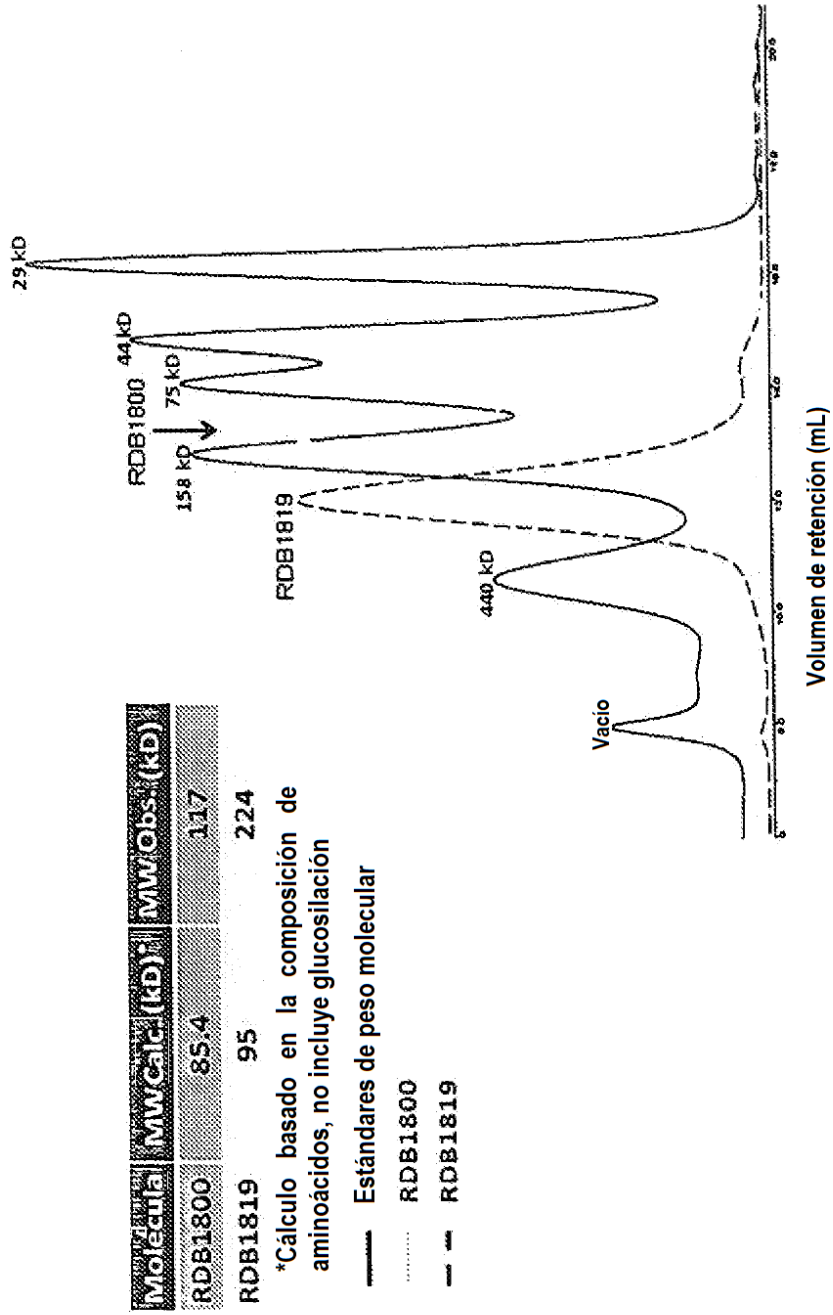


FIG. 3

El tratamiento RBD reduce el edema de pata:
(Porcentaje de reducción comparado con controles no tratados)

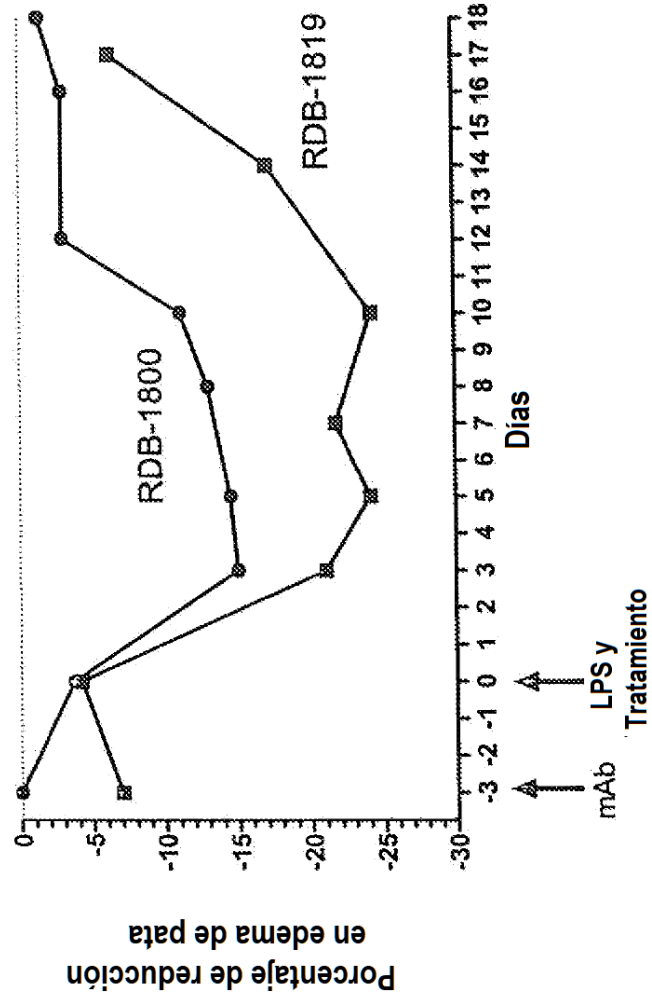


FIG. 4

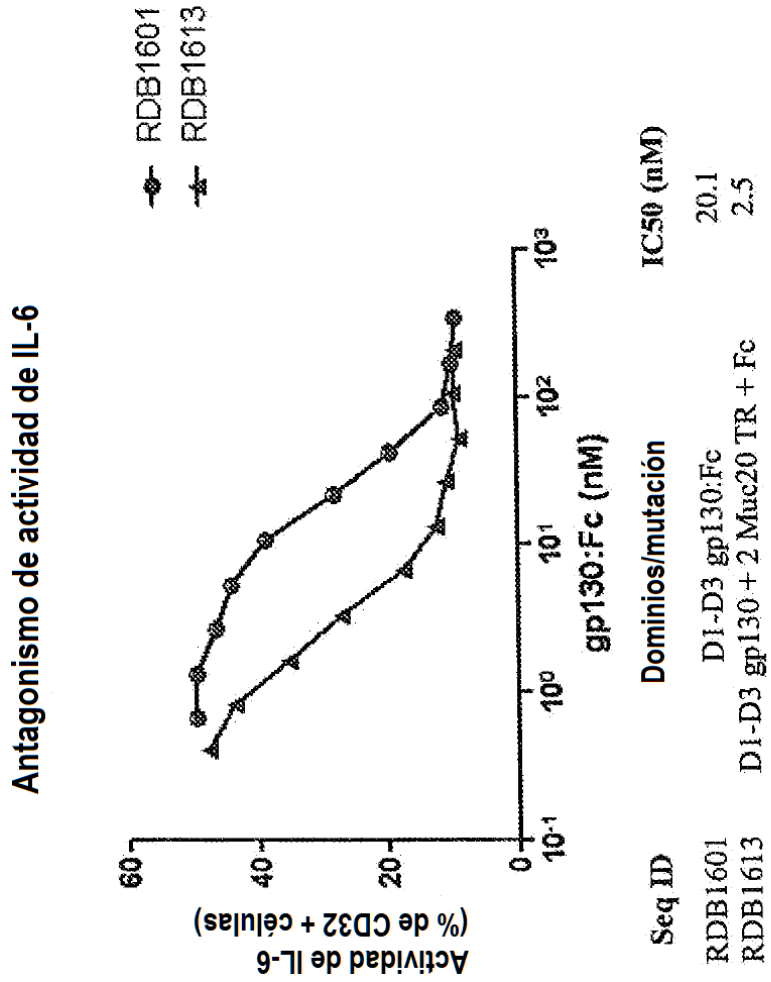


FIG. 5

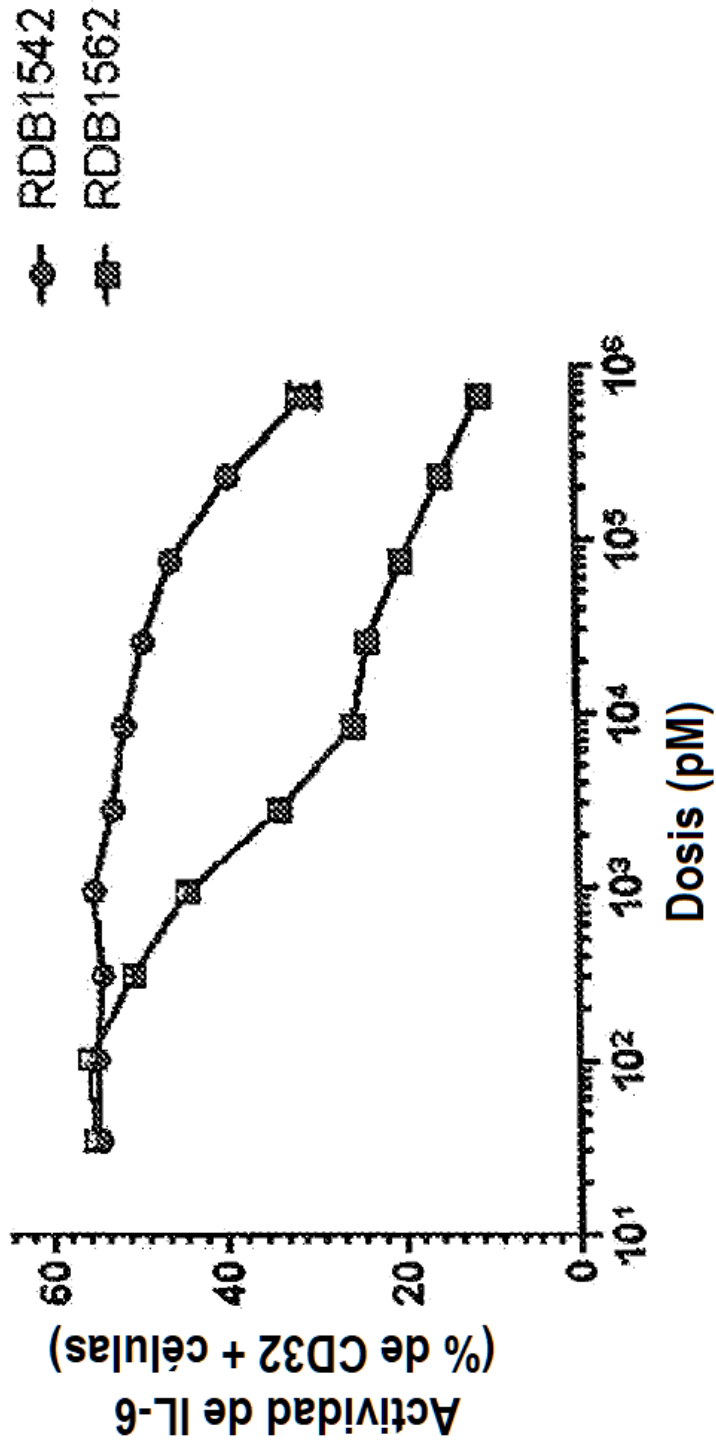


FIG. 6

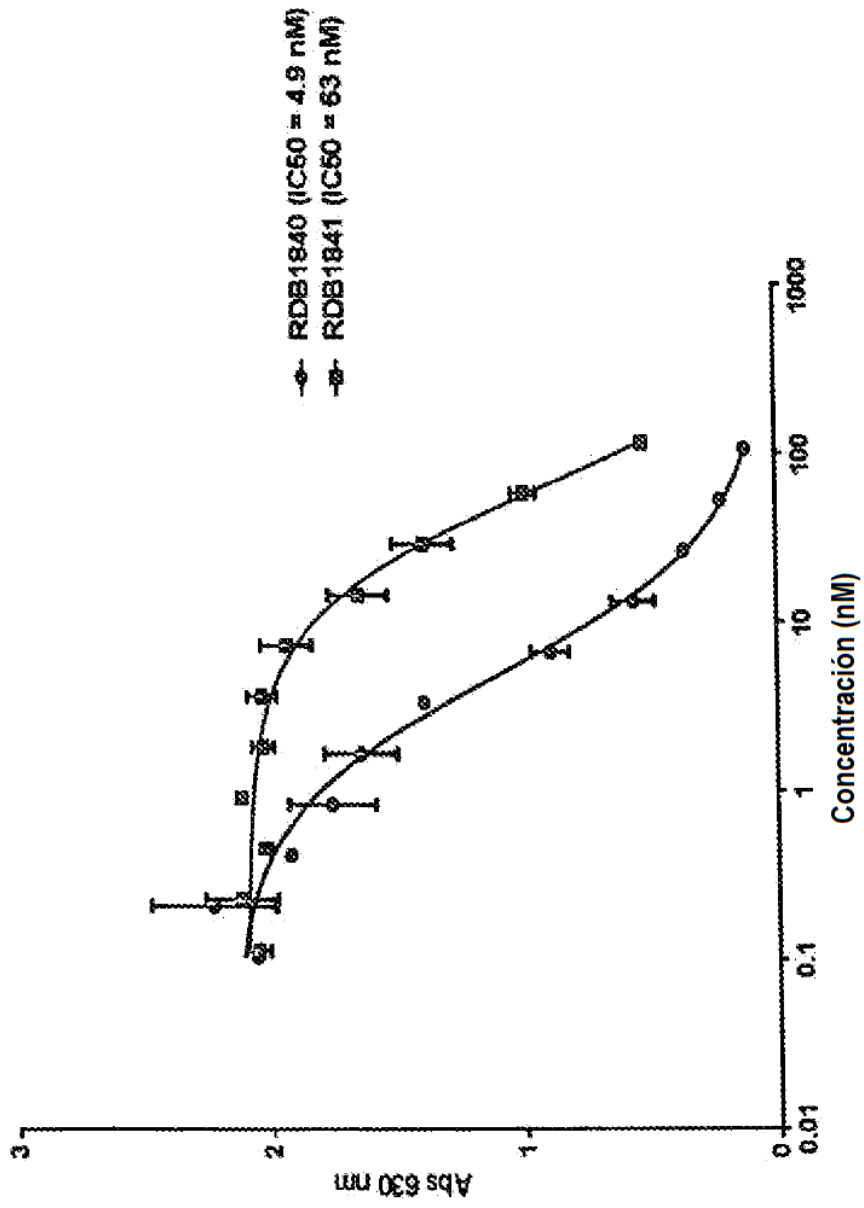


FIG. 7