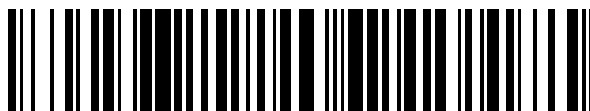


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 623**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2011** **PCT/US2011/045768**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012** **WO12016073**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2011** **E 11813204 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 2598533**

54 Título: **Proteínas de fusión de fragmentos de proteínas humanas naturales para crear composiciones Fc de inmunoglobulina multimerizada de manera ordenada**

30 Prioridad:

28.07.2010 US 368465 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2019

73 Titular/es:

GLIKNIK INC. (100.0%)
801 W. Baltimore Street, Suite 501A
Baltimore, MD 21201, US

72 Inventor/es:

BLOCK, DAVID S. y
OLSEN, HENRIK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 719 623 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de fragmentos de proteínas humanas naturales para crear composiciones Fc de inmunoglobulina multimerizada de manera ordenada

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a los campos de la inmunología, autoinmunidad, inflamación e inmunología tumoral. Más específicamente, la presente invención se refiere a moléculas biomiméticas biológicamente activas que comprenden dominios Fc de inmunoglobulina naturalmente unida, composiciones que comprenden tales biomiméticos y métodos de fabricación y uso de tales biomiméticos.

10

La invención también se refiere al tratamiento y profilaxis de afecciones patológicas mediadas por linfocitos, linfocitos NK, células derivadas de monocitos y células inmunes que interactúan con células derivadas de monocitos y, más en particular, al uso de porciones funcionales estabilizadas de fragmentos Fc de IgG unida para tal tratamiento y profilaxis.

15

Los productos de inmunoglobulina de plasma humano se han usado desde principios de 1950 para tratar trastornos de deficiencia inmune y, más recientemente, y más comúnmente, para enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

20

Inicialmente, los productos de globulina inmune se administraron mediante inyección intramuscular. Más recientemente, se ha usado globulina inmune intravenosa (IVIg) y mostró inicialmente ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria de púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) (Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, et al: High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. Lancet 6 de junio de 1981; 1(8232): 1228-31). La IVIg humana (en lo sucesivo en el presente documento denominada "hIVIg") es una formulación de productos de inmunoglobulina G (IgG) purificada, estériles, fabricados a partir de plasma humano agrupado que contiene normalmente más del 95 % de IgG no modificada, con solo cantidades pequeñas y variables de inmunoglobulina A (IgA) o inmunoglobulina M (IgM) (véase, por ejemplo, Rutter A, Luger TA: High-dose intravenous immunoglobulins: an approach to treat severe immune-mediated and autoimmune diseases of the skin. J Am Acad Dermatol 2001 Jun; 44(6): 1010-24). Hoy día, el único uso clínico más común de hIVIg es en el tratamiento de polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

25

30

Mientras que la hIVIg ha sido un tratamiento clínico eficaz, hay varios inconvenientes para los tratamientos de hIVIg, incluidos el potencial de esterilidad inadecuada, la presencia de impurezas o agentes infecciosos que incluyen virus y priones, falta de disponibilidad de este producto de sangre humana agrupado, variación de lote a lote, altos gastos, gran carga proteica que afecta a la función renal y prolongado tiempo de administración, en general, de muchas horas y a veces de dos días consecutivos mensualmente. En particular, las preparaciones de hIVIg pueden variar en gran medida en su contenido de inmunoglobulina A (IgA) que puede ser de preocupación puesto que la IgA puede provocar reacciones alérgicas y anafilácticas en receptores deficientes de IgA. En vista de los aspectos negativos de la hIVIg, existe la necesidad de medios mejorados de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias y, en particular, la necesidad de una rica fuente de producto recombinantemente producido con al menos esa eficacia equivalente, potencia superior, menor tiempo de administración y mayor pureza.

35

40

Además, múltiples afecciones patológicas de una amplia variedad de tipos se median por células derivadas de monocitos, linfocitos y linfocitos NK. Un nuevo agente terapéutico y/o profiláctico para su uso en muchas, si no todas, tales afecciones cumplirían una importante necesidad no cumplida y valiosa en el mercado.

45

Muchas de las propiedades inmuno-reguladoras de la hIVIg residen en el dominio Fc de moléculas de IgG. Por ejemplo, en modelos murinos de ITP, tanto hIVIg no modificada como el fragmento Fc solo demuestran eficacia terapéutica en el restablecimiento de recuentos plaquetarios, mientras que fragmentos Fab de hIVIg aislados no son terapéuticos (Samuelsson, A., Towers, T. L. & Ravetch, J.V. Antiinflammatory Activity of hIVIg Mediated Through the Inhibitory Fc Receptor. Science 291, 484-486 (2001)). Además, los fragmentos Fc, pero no Fab de hIVIg, son terapéuticamente eficaces en el tratamiento de púrpura trombocitopénica idiopática tanto de niños como de adultos (Follea, G. et al. Intravenous plasmin-treated gamma globulin therapy in idiopathic thrombocytopenic purpura. Nouv Rev Fr Hematol 27, 5-10 (1985); Solal-Celigny, P., Bernard, J., Herrera, A. & Biovin, P. Treatment of adult autoimmune thrombocytopenic purpura with high-dose intravenous plasmin-cleaved gammaglobulins. Scand J Haematol 31, 39-44 (1983); Debre, M. & Bonnet, M.-C. Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. Lancet 342, 945-49 (1993); Burdach, S. E., Evers, K. & Geurson, R. Treatment of acute idiopathic thrombocytopenic purpura of childhood with intravenous immunoglobulin G: Comparative efficacy of 7S and 5S preparations. J Pediatr 109, 770-775 (1986)).

50

55

60

Además la familia de receptores gamma Fc clásicos, que pueden distinguirse en miembros de activación e inhibitorios, el receptor Fc neonatal (FcRn), que pertenece a la familia de moléculas de histocompatibilidad principal de clase I (MHC-I) y SignRI/DC-SIGN, que pertenecen a la familia de lectinas tipo C, pueden unirse al fragmento Fc de IgG (Nimmerjahn and Ravetch, Antibody-mediated modulation of immune responses, Immunological Reviews,

65

236: 265-275 (2010). Adicionalmente, hay receptores tipo receptor Fc gamma en la que moléculas Fc de inmunoglobulina se unen y ejercen un efecto fisiológico (Davis RS. "Fc Receptorlike molecules" *Annu. Rev. Immunol.* 2007. 25: 525-60). El efecto terapéutico de hIVIG se media inicialmente mediante el receptor Fc gamma (FcγR) y se basa en la comunicación de macrófagos de células dendríticas (DC) para sus efectos tolerogénicos de largo plazo. FcγRIIIa tiene un papel necesario en la fase iniciadora y se requiere FcγRIIb para la fase efectora en modelos murinos de ITP (Samuelsson, A., Towers, T.L. & Ravetch, J.V. Anti-inflammatory Activity of hIVIG Mediated Through the Inhibitory Fc Receptor. *Science* 291, 484-486 (2001); Siragam, V. et al. Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fcγ receptors on dendritic cells. *Nat Med* 12, 688 (2006)). De manera similar, estudios en seres humano demuestran que los anticuerpos de receptor anti-Fcγ son eficaces en el tratamiento de ITP refractoria (Clarkson, S. et al. Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with an anti-Fc gamma-receptor antibody. *N Engl J Med* 314, 1236-1239 (1986)). De manera importante, efectos tolerogénicos a largo plazo son medidos por interacción de célula-célula, ya que la transferencia adoptiva de DC tratadas con hIVIG es eficaz en el tratamiento de modelos murinos de ITP (Siragam, V. et al. Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fcγ receptors on dendritic cells. *Nat Med* 12, 688 (2006)).

Los efectos inmunomoduladores de hIVIG requieren la agregación del FcγR. La agregación de FcγR se media mediante "dímeros" de IgG presentes en hIVIG (5-15 % de la hIVIG total) (Bleeker, W.K. et al. Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. *Blood* 95, 1856-1861 (2000)). Por ejemplo, los efectos hipotensivos clínicos inmunocirculatorios conocidos de IVIG se correlacionan con la presencia de "dímeros" en IVIG (Kroez M et. al. Hypotension with Intravenous Immunoglobulin Therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals* 31 (2003) 277-286.) Por ejemplo, en un modelo murino de ITP, el tratamiento con hIVIG con un alto contenido de "dímeros" (dímeros de moléculas de inmunoglobulinas homodiméricas completas) potenció el recuento plaquetario mientras que los "monómeros" de hIVIG (moléculas de inmunoglobulina homodiméricas completas) no fueron eficaces (Teeling, J.L. et al. Therapeutic efficacy of intravenous immunoglobulin preparations depends on the immunoglobulin G dimers: studies in experimental immune thrombocytopenia. *Blood* 98, 1095-1099 (2001)). Además, a pesar del hecho de que la resina de intercambio iónico y fraccionamiento de polietilenglicol se usan habitualmente en la fabricación de hIVIG para retirar agregados de IgG, la eficacia clínica de hIVIG se correlaciona con la presencia de agregados en el suero del paciente (Augener, W., Friedman, B. & Brittinger, G. Are aggregates of IgG the effective part of high-dose immunoglobulin therapy in adult idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)? *Blut* 50, 249-252 (1985)). De manera importante, el porcentaje de dímero también se correlaciona con efectos laterales vasoactivos, que son tratables con acetilhidrolasa (Bleeker, W.K. et al. Vasoactive side effects of intravenous immunoglobulin preparations in a rat model and their treatment with recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase. *Blood* 95, 1856-1861 (2000)).

Sumario de la invención

Existe la necesidad de una alternativa a IVIG que solucione los problemas de alta carga proteica, dosificación de paciente inconveniente, riesgo infeccioso, anafilaxis de IgA y disponibilidad limitada mientras que se mantiene y potencia la eficacia de la fracción de agregados de IVIG. La presente divulgación se refiere a moléculas biomiméticas de proteínas de fusión biológicamente activas que comprenden Fc de inmunoglobulina humana y un dominio de multimerización de origen natural único, composiciones que comprenden las mismas y métodos de uso de los mismos. Esos biomiméticos tienen una amplia aplicación para el tratamiento de trastornos inmunológicos e inflamatorios que incluyen, pero no de forma limitante a enfermedades autoinmunitarias, justo como hIVIG después de lo cual se modelan estos biomiméticos. Además, determinados de estos biomiméticos también tienen utilizar como reactivos de laboratorio, tales como para su uso en ensayo inmunológicos para someter a ensayo la función de células inmunes, en el diagnóstico de enfermedad y en el bloqueo de unión no específica de Fc en inmunoensayos a base de anticuerpos. Además, los biomiméticos y composiciones de la presente invención tienen la ventaja de superar las limitaciones anteriormente enumeradas de hIVIG así como las limitaciones de multimerización de los estradómeros biomiméticos precursores.

El documento WO 2008/151088 desvela el uso de dominios Fc de inmunoglobulina unida para crear biomiméticos de Fc de inmunoglobulina multimerizados de forma ordenada de hIVIG (multímeros ordenados biológicamente activos conocidos como estradómeros) para el tratamiento de afecciones patológicas incluidas enfermedades autoinmunitarias y otras afecciones inflamatorias. Véase el documento WO 2008/151088. Las moléculas desveladas se designaron para contener secuencias extrañas, con respecto a Fc de inmunoglobulina nativa, que incluyen sitios de restricción y marcadores de afinidad en el monómero Fc de inmunoglobulina. Estas secuencias extrañas representaban en total una pequeña fracción de la composición de aminoácidos total del estradómero (aproximadamente 16 aminoácidos totales) y se colocaron entre dominios con funciones separables y distintas, es decir, función de unión de FcR y función de multimerización. En términos generales, es de práctica común incluir pequeñas secuencias de unión entre dominios con estructuras independientes y/o funciones para evitar cualquier limitación estérica o disminuir las funciones independientes de los dominios flanqueantes. Sin embargo, como se describe en el presente documento, la retirada de estos segmentos cortos puede proporcionar un aumento notable de la formación de multímeros, unión de receptores y/o actividad biológica en su conjunto.

En una realización, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia líder, un

dominios Fc de IgG1 y un dominio de multimerización que es una bisagra de IgG2, específicamente, el polipéptido de SEQ ID NO: 4.

La bisagra de IgG2 crea multímeros del polipéptido. En una realización adicional, la secuencia líder (SEQ ID NO:1) se escinde de la proteína madura.

5 En otra realización, el dominio de multimerización bisagra de IgG2 crea multímeros. En una realización adicional, el dominio de multimerización bisagra de IgG2 crea multímeros de alto orden. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 45 % de la composición resultante contiene multímeros. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 55 % de la composición resultante contiene multímeros. En aún una
10 realización adicional, al menos aproximadamente el 65 % de la composición resultante contiene multímeros. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 70 % de la composición resultante contiene multímeros. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 73 % de la composición resultante contiene multímeros.

15 La presente divulgación se refiere adicionalmente a un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en un sujeto que la necesita que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto biomimético capaz de unir dos o más receptores Fc, que comprende al menos dos dímeros de la invención. La enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad autoinmunitaria puede seleccionarse entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I, tiroiditis autoinmune, púrpura trombocitopenia idiopática, anemia autoinmune, polineuropatía desmielinizante
20 inflamatoria crónica, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, uveítis autoinmunitaria, vasculitis positiva a ANCA, enfermedad celíaca, pénfigo, dermatopolimiositis, enfermedad de Goodpasture, miastenia grave, enfermedad de Grave, enfermedad de Kawasaki, crisis drepanocítica y dermatitis atópica. La enfermedad autoinmunitaria puede estar asociada con el trasplante de un órgano de un donante a un receptor. La enfermedad autoinmunitaria puede ser una enfermedad que no se caracteriza clásicamente como una
25 enfermedad autoinmunitaria pero en la que las células del sistema inmunitario tienen un papel importante tal como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, osteopatía y osteoporosis.

La administración puede ser por vía intravenosa, subcutánea, oral, nasal, intraperitoneal, sublingual, bucal, transdérmica, subcutánea o implante subdérmico o por vía intramuscular. En un enfoque la administración es por vía
30 intravenosa. En diversos enfoques, la administración por vía intravenosa es a una dosificación de aproximadamente 0,01 mg/Kg a aproximadamente 1000 mg/Kg IV, o de aproximadamente 0,1 mg/Kg a aproximadamente 100 mg/Kg IV, o de aproximadamente 0,5 mg/Kg a aproximadamente 50 mg/Kg IV, o de aproximadamente 1 mg/Kg a aproximadamente 25 mg/Kg IV, o de aproximadamente 5 mg/Kg a aproximadamente 15 mg/Kg IV. En un enfoque la administración es por vía subcutánea. En diversos enfoques, la administración por vía subcutánea es a una
35 dosificación de aproximadamente 0,01 mg/Kg a aproximadamente 1000 mg/Kg SQ, o de aproximadamente 0,2 mg/Kg a aproximadamente 150 mg/Kg SQ, o de aproximadamente 0,5 mg/Kg a aproximadamente 80 mg/Kg SQ, o de aproximadamente 2 mg/Kg a aproximadamente 50 mg/Kg SQ, o de aproximadamente 5 mg/Kg a aproximadamente 30 mg/Kg SQ.

40 En un enfoque, la administración es fijándola covalentemente a un dispositivo implantable, que puede ser una sutura, un injerto o stent, válvula cardíaca, un reemplazado de articulación ortopédica o conducción electrónica implantada o fijado en o incrustado dentro de una matriz implantable. En un enfoque preferente, la molécula se fija a e incrusta dentro de un hidrogel implantable, que puede estar comprendida de dextrano, poli(alcohol vinílico), poliacrilato de sodio o polímeros de acrilato. En un enfoque adicional, la molécula se administra fijada en un hidrogel
45 cuyos tamaños de poro son lo suficientemente grandes para permitir la entrada de células inmunes para interactuar con la molécula fijada y, a continuación, volver a circulación. En un enfoque adicional, el tamaño de poro del hidrogel es de 5 a 50 micrómetros. En un enfoque preferente, el tamaño de poro es de 25 - 30 micrómetros.

En un enfoque adicional, la molécula se administra antes, durante o después de la administración de uno o más
50 agentes farmacéuticos y/o terapéuticos adicionales. En un enfoque adicional el agente farmacéuticamente activo comprende un esteroide; un fármaco biológico anti-autoinmune tal como un anticuerpo monoclonal, una proteína de fusión o una anti-citocina; un fármaco no biológico anti-autoinmune; un inmunosupresor; un antibiótico; un agente antivírico; una citocina; o un agente de otro modo capaz de actuar como un modulador inmunitario. En aún un enfoque adicional, el esteroide es prednisona, prednisolona, cortisona, dexametasona, mometasona testosterona, estrógeno, oxandrolona, fluticasona, budesonida, beclametasona, albuterol o levalbuterol. En aún un enfoque
55 adicional, el anticuerpo monoclonal es infliximab, adalimumab, rituximab, tocilizumab, golimumab, ofatumumab, LY2127399, belimumab, veltuzumab o certolizumab. En aún un enfoque adicional, la proteína de fusión es etanercept o abatacept. En aún un enfoque adicional, el biológico anti-citocina es anakinra. En aún un enfoque adicional, el fármaco no biológico antirreumático es ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina, hidroxicloroquina, leflunomida, minociclina, compuestos de oro orgánicos, fostamatinib, tofacitinib, etoricoxib o sulfasalazina. En aún un
60 enfoque adicional, el inmunosupresor es ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, micofenolato de mofetilo, everolimus, OKT3, globulina antitimocítica, basiliximab, daclizumab o alemtuzumab. En aún un enfoque adicional, la molécula de la invención se administra antes, durante, o después de la administración de un agente quimioterapéutico. En aún un enfoque adicional, la molécula de la invención y el agente terapéutico adicional muestran una sinergia terapéutica
65 cuando se administran juntos. En un enfoque, la molécula de la invención se administra antes de la administración del agente terapéutico adicional. En otro enfoque, la molécula de la invención se administra al mismo tiempo que la

administración del agente terapéutico adicional. En otro enfoque más, la molécula de la invención se administra después de la administración con el agente terapéutico adicional.

Aún en otro enfoque la divulgación se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesita que comprende la administración de una cantidad eficaz de una molécula biomimética que comprende al menos dos dímeros de polipéptidos de SEQ ID NO:4. Aún en otra realización, la enfermedad infecciosa es infección bacteriana. En otra realización más, la enfermedad infecciosa es infección vírica. En una realización adicional, la enfermedad infecciosa es sepsis bacteriana o vírica. En un enfoque adicional, la administración es por vía intravenosa, subcutánea, oral, intraperitoneal, sublingual, bucal, transdérmica, subcutánea o implante subdérmico o por vía intramuscular. En diversos enfoques, la administración por vía intravenosa es a una dosificación de aproximadamente de 0,01 mg/Kg a aproximadamente 1000 mg/Kg, o de aproximadamente 0,1 mg/Kg a aproximadamente 100 mg/Kg, o de aproximadamente 0,5 mg/Kg a aproximadamente 50 mg/Kg, o de aproximadamente 1 mg/Kg a aproximadamente 25 mg/Kg, o de aproximadamente 5 mg/Kg a aproximadamente 15 mg/Kg.

En otro enfoque, la molécula se administra para tratar seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuínos y chimpancés), ratones, ratas, bovinos, caballos, gatos, perros, cerdos, conejos, cabras, ciervo, oveja, hurones, jerbos, cobayas, hámsteres, murciélagos, pájaros, pollos, pavos y patos), peces y reptiles con moléculas de estradómero específicas de especie o quiméricas. En otro enfoque más, el ser humano es un adulto o un niño. En otro enfoque más, la administración es para prevenir una enfermedad autoinmunitaria. En un enfoque adicional la administración es para prevenir afecciones autoinmunitarias asociadas a vacunas en compañía de animales y ganado.

En otra realización más, la presente invención se refiere a un método para bloquear la unión no específica de anticuerpos en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* que comprende la incubación de un tejido diana o células diana con una composición que comprende una cantidad eficaz de un compuesto biomimético que comprende al menos dos dímeros de polipéptidos de SEQ ID NO:4. En un enfoque, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En otro enfoque, los anticuerpos son anticuerpos policlonales. En un enfoque, el ensayo *in vitro* o *ex vivo* es inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia Western o un ensayo inmunofluorescente. En un enfoque adicional, la molécula biomimética es específica a especie para la especie del tejido o células diana.

En una realización, la presente invención se refiere a un método de producción de una molécula biomimética de una células transfectada que comprende la clonación de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:4 en un vector de expresión, transfectar el vector de expresión en un huésped bacteriano, aislar el ADN de plásmido que contiene ADN que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:4 del cultivo bacteriano, linealizar el ADN de plásmido que contiene ADN que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:4, transfectar el ADN linealizado en células de mamífero, expandir las células positivamente transfectadas para obtener una agrupación de células establemente transfectadas, cultivar el polipéptido de SEQ ID NO:4 del medio y purificar el polipéptido de SEQ ID NO:4, en donde el polipéptido no contiene secuencias extrañas. En una realización, el vector de expresión contiene un marcador de selección. En una realización adicional, el marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos. En aún una realización adicional, el gen de resistencia a antibióticos es un gen de resistencia a neomicina. En una realización, las células de mamífero son células CHO, células HEK293, células PER.C6, células CAP u otras células de mamífero relevantes disponibles en el mercado usadas para la producción de proteínas. En una realización, la proteína se purifica mediante cromatografía por afinidad. En una realización adicional, la proteína se purifica adicionalmente mediante filtración de gel. En una realización adicional, la proteína se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. En una realización adicional la proteína se purifica adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es un esquema del polipéptido preferente de la presente invención con otros para su comparación. La Figura 1a es un esquema de G045c; La Figura 1b es un esquema de G045old; La Figura 1c es un esquema de G046; La Figura 1d es un esquema de G019; La Figura 1e es un esquema de G028; La Figura 1f es un esquema de G051; La Figura 1g es un esquema de G089; y la Figura 1h es un esquema de G096.

La **Figura 2 A)** es un gel de proteínas que muestra las diferencias en capacidad de multimerización entre compuestos de primera generación y los compuestos directos naturalmente unidos de la presente divulgación. B) es una comparación entre la formación de multímero/monómero entre los compuestos de primera generación y los compuestos directos naturalmente unidos de la presente divulgación.

La **Figura 3** muestra el mayor efecto de la molécula directa naturalmente unida (M045c) de la presente divulgación en comparación con el del compuesto previo que contiene las secuencias extrañas (M045antigua) sobre la gravedad de artritis inducida por colágeno.

La **Figura 4** muestra el efecto sinérgico que tienen los compuestos directos naturalmente unidos de la presente divulgación cuando se administran con prednisolona en una artritis inducida por colágeno.

La **Figura 5** muestra la afinidad de unión aumentada de los compuestos M046, M045, M019 y M028 de la presente divulgación a FcγRIIIa, FcγRIIb y SIGN-R1 en comparación con controles de IgG2a.

La **Figura 6** muestra la afinidad de unión aumentada de los compuestos de la presente divulgación a (a) FcγRIIb y FcγRIIIa y (b) SIGN-R1. M045 F1 es una fracción de multímero de mayor peso molecular de la molécula

mientras que M045 F2 es la fracción de multímero de menor peso molecular. M045 F3 es la fracción de homodímero de la molécula.

La **Figura 7** muestra el efecto del M045c directamente unido sobre la gravedad de púrpura trombocitopenia idiopática (ITP).

La **Figura 8** muestra que las moléculas biomiméticas bloquean más eficazmente la unión de anticuerpos anti-FcγR a FcγR con respecto a Fc de IgG1 de control.

La **Figura 9** muestra el efecto de M045c, M019, M028, M046 y M051 directamente unido sobre la gravedad de un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno.

La **Figura 10** muestra la unión aumentada de G075 a FcγRIIIa y unión reducida de G075 a FcγRIIa y FcγRIIb. B muestra el aumento de afinidad de unión de G076 a FcγRIIa y FcγRIIb y unión reducida de G076 a FcγRIIIa.

La **Figura 11** muestra el efecto de M051 en comparación a IVIg y controles de albúmina sobre (a) pérdida de peso asociada con neuritis autoinmunitaria experimental en ratas (EAN); (B) puntuación clínica en ratas EAN; (C) amplitud de cadera en ratas EAN; (D) amplitud de tobillo en ratas EAN; y (E) velocidad de conducción de nervio motor en ratas EAN.

La **Figura 12** muestra el efecto de M045c en comparación a IVIg y controles de albúmina sobre (a) pérdida de peso asociada con neuritis autoinmunitaria experimental en ratas (EAN); (B) puntuación clínica en ratas EAN; (C) amplitud de cadera en ratas EAN; (D) amplitud de tobillo en ratas EAN; y (E) velocidad de conducción de nervio motor en ratas EAN.

La **Figura 13** muestra el efecto superior de M075 (A), M096 (B) y M098 (C) pero no de M076 (A) en comparación con el del vehículo de control y control positivo de M045c sobre la gravedad de artritis inducida por colágeno.

Descripción detallada de la invención

El enfoque al diseño molecular racional para compuestos de reemplazo de hIVIG descrito en el presente documento incluye la creación recombinante y/o bioquímica de biomimético(s) inmunológicamente activo(s) que es/son sorprendentemente más eficaces en la multimerización y, por consiguiente, unión a receptores Fc gamma que moléculas previamente descritas que tenían por objeto conseguir este fin. Los compuestos de reemplazo tienen utilidad para el tratamiento, por ejemplo, de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, cáncer y sepsis. Debido a la superior afinidad de unión a receptores Fc gamma con respecto a inmunoglobulina nativa, las composiciones también tienen utilidad como reactivos Fc de bloqueo en inmunoensayos a base de anticuerpos y en la retirada de endotoxinas de composiciones farmacéuticas y de laboratorio. Cada realización se describe en detalle a continuación junto con realizaciones a modo de ejemplo específicas.

Como se usa en el presente documento, el uso de la palabra "un", "uno/una", cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

Como se usa en el presente documento, Los términos "biomimético", "molécula biomimética", "compuesto biomimético" y términos relacionados, se refieren a un compuesto fabricado por el ser humano que imita la función de otro compuesto, tal como hIVIG agrupada, un anticuerpo monoclonal o el fragmento Fc de un anticuerpo. Los biomiméticos "biológicamente activos" son compuestos que poseen actividades biológicas que son las mismas que o similares a sus homólogos de origen natural. Por "de origen natural" se refiere a una molécula o porción de la misma que se encuentra normalmente en un organismo. Por origen natural también se refiere a parcialmente de origen natural. Los biomiméticos "inmunológicamente activos" son biomiméticos que muestran actividad inmunológica que es la misma que o similar a moléculas inmunológicamente activas de origen natural, tales como anticuerpos, citocinas, interleucinas y otras moléculas inmunológicas conocidas en la técnica.

Por "unida directamente" se refiere a dos secuencias conectadas entre sí sin secuencias de intervención o extrañas, por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o fragmentos de clonación. Un experto en la técnica comprenderá que "directamente unido" engloba la adición o retirada de aminoácidos siempre y cuando la capacidad de multimerización no se vea sustancialmente afectada.

Por "homólogo" se refiere a la identidad sobre la secuencia completa de una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos dada. Por ejemplo, por "80 % de homología" se refiere a que una secuencia dada comparte aproximadamente el 80 % de identidad con la secuencia reivindicada y puede incluir inserciones, delecciones, sustituciones y cambios de marco. Un experto en la técnica comprenderá que las alineaciones secuenciales se pueden realizar teniendo en cuenta inserciones y delecciones para determinar la identidad de la longitud completa de una secuencia.

Los biomiméticos inmunológicamente activos de la presente invención están designados para poseer una o más actividad de modulación inmunitaria del dominio Fc de IgG y tiene al menos (i) un primer dominio Fc capaz de unir FcRn, DC-SIGN, SIGN-R1 y/o un FcγR que incluye FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRIV, y (ii) un segundo dominio Fc capaz de unir FcRn, DC-SIGN, SIGN-R1 y/o un FcγR, que incluye FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRIV. Específicamente, los compuestos inmunológicamente activos de la presente invención son multímeros de homodímeros. Poseyendo cada homodímero la capacidad de unirse a FcRn, DC-SIGN, SIGN-R1 y/o y FcγR. Por lo tanto, cuando están multimerizados, los biomiméticos inmunológicamente activos contiene al menos dos homodímeros poseyendo cada

uno la capacidad de unirse a FcRn, DC-SIGN, SIGN-R1 y/o y FCyR.

Los siguientes párrafos definen los bloques de construcción de los biomiméticos de la presente invención, tanto estructural como funcionalmente y, a continuación, definen los biomiméticos mismos. Sin embargo, sirve de ayuda señalar que, tal como se ha indicado anteriormente, cada uno de los biomiméticos de la presente invención tiene al menos dos dominios Fc. Como mínimo, un dominio Fc es un polipéptido dimérico (o región dimérica de un polipéptido más grande) que comprende dos cadenas peptídicas o brazos (monómeros) que se asocian para formar un sitio de unión de receptor de Fcγ funcional. Por lo tanto, la forma funcional de los fragmentos individuales y dominios que se describen en el presente documento existen en una forma dimérica (o multimérica). Los monómeros de los fragmentos individuales y dominios que se describen en el presente documento son cadenas únicas o brazos que deben asociarse con una segunda cadena o brazo para formar una estructura dimérica funcional.

Fragmento Fc

"Fragmento Fc" es un término de la técnica que se usa para describir la región proteica o estructura plegada de proteína que se encuentra habitualmente en el extremo carboxi de inmunoglobulinas. El fragmento Fc puede aislarse del fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal mediante el uso de digestión enzimática, por ejemplo, digestión de papaína, que es un proceso incompleto e imperfecto (véase Mihaesco C and Seligmann M. Papain Digestion Fragments Of Human IgM Globulins. Journal of Experimental Medicine, Vol 127, 431-453 (1968)). Junto con el fragmento Fab (que contiene el dominio de unión a antígeno) el fragmento Fc constituye el holo-anticuerpo, que significa aquí el anticuerpo completo. El fragmento Fc consiste en las porciones terminales carboxi de las cadenas pesadas de anticuerpo. Cada una de las cadenas de un fragmento Fc se encuentra entre aproximadamente 220-265 aminoácidos de longitud y las cadenas se unen a menudo mediante un enlace disulfuro. El fragmento Fc contiene a menudo uno o más pliegues estructurales independientes o subdominios funcionales. En particular, el fragmento Fc engloba un dominio Fc, definido en el presente documento como la estructura mínima que une un receptor Fcγ. Un fragmento Fc aislado está comprendido de dos monómeros de fragmento Fc (por ejemplo, las dos porciones terminales carboxi de las cadenas pesadas de anticuerpo; definidas adicionalmente en el presente documento) que se dimerizan. Cuando se asocian dos monómeros de fragmento Fc, el fragmento Fc resultante tiene actividad de unión de receptor Fcγ.

Fragmento Fc parcial

Un "fragmento Fc parcial" es un dominio que comprende menos del fragmento Fc completo de un anticuerpo, aunque retiene estructura suficiente para tener la misma actividad que el fragmento Fc, incluyendo actividad de unión a receptor Fcγ. Un fragmento Fc parcial puede carecer por lo tanto de la totalidad o parte de la región bisagra, la totalidad o parte de un dominio CH2, la totalidad o parte de un dominio CH3, y/o la totalidad o parte de un dominio CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo del que procede el dominio Fc parcial. Un ejemplo de un fragmento Fc parcial incluye una molécula que comprende las regiones bisagra superior, de núcleo e inferior más el dominio CH2 de IgG3 (Tan, LK, Shopes, RJ, Oi, VT and Morrison, SL, Influence of the hinge region on complement activation, Clq binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 January; 87(1): 162-166). Por lo tanto, en este ejemplo, el fragmento Fc parcial carece del dominio CH3 presente en el fragmento Fc de IgG3. Otro ejemplo de un fragmento Fc parcial incluye una molécula que comprende los dominios CH2 y CH3 de IgG1. En este ejemplo, el fragmento Fc parcial carece del dominio bisagra presente de IgG1. Los fragmentos Fc parciales están comprendidos de dos monómeros de fragmento Fc parcial. Como se define adicionalmente en el presente documento, cuando se asocian dos tales monómeros de fragmento Fc parciales, el fragmento Fc parcial resultante tiene actividad de unión de receptor Fcγ.

Dominio Fc

Como se usa en el presente documento, "dominio Fc" describe la región mínima (en el contexto de un polipéptido más grande) o estructura plegada de proteína más pequeña (en el contexto de una proteína aislada) que puede unirse o ser unido por un receptor Fc (FcR). En tanto un fragmento Fc como un fragmento Fc parcial, el dominio Fc es la región de unión mínima que permite la unión de la molécula a un receptor Fc. Mientras que un dominio Fc puede limitarse a un polipéptido diferenciado que se une por un receptor Fc, también resultará claro que un dominio Fc puede ser la totalidad o parte de un fragmento Fc, así como la totalidad o parte de un fragmento Fc parcial. Cuando el se usa el término "dominios Fc" en la presente invención un experto en la técnica reconocerá su significado como más de un dominio Fc. Un dominio Fc está comprendido de dos monómeros de dominio Fc. Como se define adicionalmente en el presente documento, cuando se asocian dos tales monómeros de dominio Fc, el dominio Fc resultante tiene actividad de unión de receptor Fc. De este modo, un dominio Fc es una estructura dimérica que puede unir un receptor Fc.

Dominio Fc parcial

Como se usa en el presente documento, "dominio Fc parcial" describe una porción de un dominio Fc. Los dominios Fc parciales incluyen los dominios de región constante de cadena pesada individuales (por ejemplo, dominios CH1,

CH2, CH3 y CH4) y regiones bisagra de las distintas clases y subclases de inmunoglobulina. Por lo tanto, los dominios Fc parciales de ser humano de la presente invención incluyen los dominios CH1 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, los dominios CH2 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, los dominios CH3 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, los dominios CH4 de IgM e IgE y las regiones bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE. Los dominios Fc parciales correspondientes en otras especies dependerán de las inmunoglobulinas presentes en esa especie y el nombre de las mismas. Preferentemente, los dominios Fc parciales de la presente invención incluyen dominios CH1, CH2 y dominios bisagra de IgG1 y el dominio bisagra de IgG2. El dominio Fc parcial de la presente invención puede comprender adicionalmente una combinación de dos o más de estos dominios y bisagras. Sin embargo, los dominios Fc parciales individuales de la presente divulgación y combinaciones de los mismos carecen de la capacidad de unir un FcγR. Por lo tanto, los dominios Fc parciales y combinaciones de los mismos comprenden menos de un dominio Fc. Los dominios Fc parciales pueden unirse juntos para formar un péptido que tiene actividad de unión de receptor Fcγ, formando, de este modo, un dominio Fc. En la presente invención, los dominios Fc parciales se usan con dominios Fc como los bloques de construcción para crear los biomiméticos de la presente divulgación, como se define en el presente documento. Cada uno del dominio Fc parcial está comprendido de dos monómeros de dominio Fc parcial. Cuando se asocian dos tales monómeros de dominio Fc parciales, se forma un dominio Fc parcial.

Como se indicó anteriormente, cada uno de los fragmentos Fc, fragmentos Fc parciales, dominios Fc y dominios Fc parciales son proteínas diméricas o dominios. Por lo tanto, cada una de estas moléculas está comprendida de dos monómeros que se asocian para formar la proteína dimérica o dominio. Mientras que las características y actividad de las formas homodiméricas se ha descrito anteriormente los péptidos monoméricos se describen del siguiente modo.

Monómero de fragmento Fc

Como se usa en el presente documento, un "monómero de fragmento Fc" es una proteína de cadena única que, cuando se asocia con otro monómero de fragmento de Fc, que comprende un fragmento Fc. El monómero de fragmento Fc es, de este modo, la porción terminal carboxi de una de las cadenas pesadas de anticuerpos que forman el fragmento Fc de un holo-anticuerpo (por ejemplo, la porción contigua de la cadena pesada que incluye la región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de IgG). En un enfoque, el monómero de fragmento Fc comprende, como mínimo, una cadena de una región bisagra (un monómero bisagra), una cadena de un dominio CH2 (un monómero de dominio CH2) y una cadena de un dominio CH3 (un monómero de dominio CH3), unido de forma contigua para formar un péptido. En otro enfoque, el monómero de fragmento Fc comprende al menos una cadena de una región bisagra, una cadena de un dominio CH2, una cadena de un dominio CH3 y una cadena de un dominio CH4 (un monómero de dominio CH4) unido de forma contigua para formar un péptido. En un enfoque, los dominios CH2, CH3 y bisagra son de distintos isotipos. En un enfoque particular, el monómero de fragmento Fc contiene un dominio bisagra de IgG2 y dominio CH2 y CH3 de IgG1.

Monómero de dominio Fc

Como se usa en el presente documento, "Monómero de dominio Fc" describe la proteína de cadena única que, cuando se asocia con otro monómero de dominio de Fc, comprende un dominio Fc que puede unir un receptor Fcγ. La asociación de dos monómeros de dominio Fc crea un dominio Fc. Un monómero de dominio Fc solo, que comprende solo un lado de un dominio Fc, no puede unir un receptor Fcγ. Los monómeros de dominio Fc de la presente divulgación no contienen secuencias extrañas como lo hicieron los monómeros de dominio Fc previamente descritos (véase, documento WO 2008/151088, figuras 17 y 18). En su lugar, los monómeros de dominio Fc de la presente invención (SEQ ID NO:2) se unen directamente a la secuencia líder (SEQ ID NO:1) en un extremo (por ejemplo, el extremo N del monómero Fc) y al dominio de multimerización (SEQ ID NO:3) en el otro extremo (por ejemplo, el extremo C del monómero Fc). El monómero resultante de SEQ ID NO :4 se denomina en el presente documento G045c. En otro enfoque, el monómero de dominio Fc comprende un dominio bisagra de IgG2 y los dominios CH2 y CH3 de IgG1 están unidos directamente a la secuencia líder (SEQ ID NO:1) del extremo N. El monómero resultante de SEQ ID NO: 18 se denomina en el presente documento G051. Como alternativa, el dominio de multimerización (SEQ ID NO:3) puede colocarse en el extremo amino del monómero de dominio Fc (SEQ ID NO:2). El monómero resultante de SEQ ID NO: 8 se denomina en el presente documento G019. Como alternativa, el dominio de multimerización puede comprender SEQ ID NO:5 en lugar de SEQ ID NO:3 y se puede colocar en el extremo carboxi del monómero de dominio Fc, dando como resultado SEQ ID NO: 10 o puede colocarse en el extremo amino del monómero de dominio Fc, dando como resultado SEQ ID NO:9. Estos se denominan en el presente documento G046 y G028, respectivamente.

Monómero de dominio Fc parcial

Como se usa en el presente documento, "Monómero de dominio Fc parcial" describe la proteína de cadena única que, cuando se asocia con otro monómero de dominio de Fc parcial, comprende un dominio Fc parcial. La asociación de dos monómeros de dominio Fc parciales crea un dominio Fc parcial.

Los biomiméticos de la presente invención son compuesto biomiméticos capaces de unir dos o más receptores Fc,

preferentemente, dos o más receptores Fcγ y, más preferentemente, que demuestran una unión significativamente mejorada con respecto a un dominio Fc y, lo más preferentemente, que demuestran una característica de lenta disociación de avidéz. En una realización preferida, las moléculas biomiméticas de la presente invención e usan para unir receptores FcRn, DC-SIGN, SIGN-R1 y/o Fcγ sobre células efectoras tales como linfocitos NK y células dendríticas inmaduras y otras células procedentes de monocitos. En una realización, los receptores Fcγ son receptores Fcγ de baja afinidad. Son los monómeros de dominio Fc individuales y monómeros de dominio Fc parciales, también descritos anteriormente, que se producen, en primer lugar y que después se auto asocian para formar las estructuras diméricas que son las moléculas de la presente invención.

Las moléculas descritas en el presente documento incluyen:

Tabla 1

Estradómero	Secuencia
G045c (SEQ ID NO:4)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKERKCCVECP
G019 (SEQ ID NO:8)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGERKCCVECPPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
G028 (SEQ ID NO:9)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGGGSIKQIEDKIEEILSKIYHIENIARIKKLIGERGHGGGSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
G046 (SEQ ID NO:10)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

	KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGGGSIKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERG
--	---

(continuación)

Estradómero	Secuencia
G051 (SEQ ID NO:18)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGERKCCVECPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.
G075 (SEQ ID NO:20)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKERKCCVECPPCP.
G076 (SEQ ID NO:21)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYAVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKERKCCVECPPCP.
G096 (SEQ ID NO:28)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGGPPGPPGPPGPPGPPGPPG PPGPPGPPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(continuación)

Estradómero	Secuencia
G098 (SEQ ID NO:24)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPP
G089 (SEQ ID NO:27)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPPGPP

Como ejemplo esclarecedor, el experto en la técnica comprenderá que una molécula, tal como una molécula de la presente invención que comprende el polipéptido de SEQ ID NO:4, puede construirse preparando una molécula de polinucleótido codificante. Tal molécula de polinucleótido puede insertarse en un vector de expresión, que puede usarse para transformar una población de bacterias o transfectar una población de células de mamífero. Entonces, se pueden producir monómeros cocultivando las bacterias transformadas o células de mamífero transfectadas en las condiciones de cultivo adecuadas. Por ejemplo, una línea celular clonal que continúa una agrupación de células establemente transfectadas puede conseguir seleccionado células con genetecina/G418. Como alternativa, se pueden transfectar transitoriamente células con ADN que codifica la molécula de la presente invención, es decir, G045c (SEQ ID NO:4) u otra molécula desvelada, tal como G019 (SEQ ID NO: 8), G028 (SEQ ID NO:9) G046 (SEQ ID NO:10) o G051 (SEQ ID NO:18) bajo el control del promotor CMV. Los monómeros expresados pueden entonces formar moléculas funcionales cuando hay o bien auto-agregación de los monómeros o asociación de monómeros que usan uniones de monómeros de inter-polipéptidos. Las moléculas expresadas pueden entonces purificarse desde el medio de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, columnas de proteína A o proteína G.

Sorprendentemente, la G045c (SEQ ID NO:4) producida mediante los métodos de la presente invención que contiene las secuencias reivindicadas de la secuencia líder (SEQ ID NO:1) unida directamente al extremo N de Fc de IgG1 (SEQ ID NO:2) que, a su vez, está directamente unida mediante su extremo al dominio de multimerización bisagra de IgG2 (SEQ ID NO:3) conduce al orden superior de formación de multímeros que se ha observado con las moléculas predecesoras que contenían secuencias extrañas que se pensaba que no tenían importancia funcional, tal como sitios de restricción en el monómero Fc de IgG1, como se muestra en las SEQ ID NO: 6 y 7. De hecho, cerca del 74 % de la preparación de G045c resultante contiene multímeros mientras que solo aproximadamente el 26 % de la composición contiene monómeros. Esto contrasta con las preparaciones que contienen las moléculas con las secuencias extrañas. Estas preparaciones contienen solo aproximadamente el 27 % de multímeros y el 72 % de la composición está presente como monómeros. Además, el orden superior de multímeros producidos por los monómeros de la SEQ ID NO:4 tuvieron una eficacia sorprendentemente superior cuando se compararon con la secuencia extraña antigua que contenía polipéptidos previamente descritos. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el dominio de multimerización crea multímeros de alto orden de las unidades. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 45 % de la composición resultante contiene multímeros de las unidades. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 55 % de la composición resultante contiene multímeros de las unidades. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 65 % de la composición resultante contiene multímeros de las unidades. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 70 % de la composición resultante contiene multímeros de las unidades. En aún una realización adicional, al menos aproximadamente el 73 % de la composición resultante contiene multímeros de las unidades.

Una unión separada que se encuentra en los compuestos biomiméticos de la presente invención es la unión que se produce entre dos o más monómeros individuales que comprende las moléculas de la presente invención. Mientras que las uniones de dominio son secuencias de aminoácidos cortas que sirven para unir los monómeros de dominio Fc y monómeros de dominio Fc parciales que comprenden monómeros individuales de los compuestos biomiméticos entre sí, las uniones sirven para juntar dos o más monómeros individuales que comprenden los compuestos biomiméticos. La unión puede ser cualquier unión capaz de asociar establemente los monómeros individuales. En algunas realizaciones, la unión puede ser un enlace covalente entre los monómeros. Como alternativa, la unión entre monómeros puede ser mediante reticulación química directa. En realizaciones preferidas, las estructuras monoméricas se aprovechan de las propiedades de autoagregación naturales entre los monómeros de dominio Fc para crear estradómeros de autoagregación. En ciertas de estas realizaciones, la autoagregación se produce sin uniones de enlace de disulfuro covalente que se encuentra normalmente en la naturaleza. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, IgG1 intacta, por ejemplo, tiene 2 enlaces cisteína en la región bisagra (Dorai H. Role of inter-heavy and light chain disulfide bonds in the effector functions of human immunoglobulin IgG1. Molecular Immunology. 29;12, 1992,1487-1491; Meulenbroek AJ and Zeijlemaker WP. Human IgG Subclasses: Useful diagnostic markers for immunocompetence. ISBN 90-5267-011-0) mientras que los dominios bisagra de IgG1, CH2 de IgG1 y CH3 de IgG1 de G045 demuestran que no hay uniones de intermonómeros; en G045 todas las uniones de intermonómeros se producen en el extremo C del dominio bisagra de IgG2. En otras tales realizaciones se forman enlaces disulfuro entre los monómeros individuales para formar los dímeros. Los enlaces disulfuro forman entre los restos cisteína de los monómeros de dominio Fc que comprende las moléculas biomiméticas, que usan o bien restos cisteína que se producen en la secuencia de monómero de dominio Fc natural o restos cisteína incorporados en un monómero de dominio Fc mediante mutagénesis dirigida a sitio. Tales propiedades de autoagregación natural también se pueden usar para formar las uniones entre monómeros individuales en multímeros. En una realización preferida, los restos cisteína que forman la unión se encuentran en las posiciones 236, 237, 240 y 243 del dominio bisagra de IgG2 de la proteína madura de G045.

Estradómero agrupado

Un "estradoómero agrupado" es un biomimético que tiene una forma radial con una fracción central "cabeza" y dos o más "piernas", en donde cada pierna comprende uno o más dominios Fc que es capaz de unir al menos un receptor Fc gamma, creando, de este modo, un biomimético capaz de unir dos o más receptores Fc gamma. Cada estradoómero agrupado está comprendido de más de una proteína dimérica, cada una denominada una "unidad de estradoómero agrupado". Cada unidad de estradoómero agrupado está comprendida de una región que multimeriza y una región de "pierna" que comprende al menos un dominio Fc funcional. La región de multimerización crea una "cabeza" de estradoómero agrupado una vez se ha multimerizado con otra unidad de estradoómero agrupado. La región de pierna es capaz de unir tanto receptores Fc γ como dominios Fc haya en cada región de pierna. De este modo, un estradoómero agrupado es un compuesto biomimético capaz de unir dos o más receptores Fc γ , aumentando la afinidad de unión y avidéz.

La región de multimerización hace que las proteínas diméricas se multimericen adicionalmente y es una bisagra de IgG2 como se conoce en la técnica, la región bisagra de IgG2 humana puede formar dímeros covalentes (Yoo, E.M. et al. J. Immunol. 170, 3134-3138 (2003); Salfeld Nature Biotech. 25, 1369-1372 (2007)). La formación de dímeros de IgG2 está mediante potencialmente mediante la estructura de bisagra de IgG2 mediante enlaces C-C (Yoo et al 2003), lo que sugiere que la estructura bisagra sola puede medir la formación de dímeros. La cantidad de dímeros de IgG2 que se encuentra en el suero humano, sin embargo, es limitada. Se estima que la cantidad de IgG2 existente como dímero del homodímero es inferior al 10 % de la IgG2 total (Yoo et al. 2003). Además, no hay pruebas cuantitativas del dominio de multimerización de IgG2 más allá del dímero del homodímero. (Yoo et al. 2003). Es decir, no se ha encontrado IgG2 nativa para formar multímero de orden superior en suero humano. Por lo tanto, los resultados que se presenten en el presente documento son particularmente sorprendentes por que los polipéptidos que contienen bisagra de IgG2 (es decir, G045c, G019 y G051) están presentes en multímeros de alto orden y a diferencia de IgG2 nativa en suero humano en la que las interacciones de bisagra de IgG2 son variables y dinámicas, se ha demostrado que G045c forma multímeros altamente estables que se ha demostrado sobre geles SDS-PAGE no reductores, mediante ultracentrifugación analítica y mediante estudios de estabilidad de 3 meses al 100 % de humedad a 37 °C. Además, también resulta sorprenden que la cantidad de multímeros en las preparaciones que contienen bisagra de IgG2 son significativamente superiores que el 10 % observado para IgG2 en suero humano. Por ejemplo, la cantidad de multímeros, incluidos dímeros del homodímero en preparaciones de G045c es de aproximadamente el 67 %.

La secuencia de aminoácidos del monómero bisagra de IgG2 es la siguiente: ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:3).

Mientras que se ha encontrados que los multímeros de orden superior son eficaces en la modulación de la respuesta inmunitaria, hemos encontrado sorprendentemente que los homodímeros también fueron eficaces moduladores inmunitarios. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que los homodímeros son capaces de formar multímero con orden superior *in vivo*. Hemos encontrado mediante experimentos de multimerización que, de otro modo, una población pura de homodímeros es capaz de multimerizar en presencia de bajos niveles de sangre o suero bovino fetal. Por lo tanto, mientras que multímeros con orden superior son más eficaces que la fracción de

homodímeros en la modulación de la respuesta inmunitaria, la fracción de homodímeros de los polipéptidos unidos naturalmente de la presente invención también pueden ser eficaces moduladores inmunitarios, en parte mediante multimerización del homodímero en presencia de bajos niveles de sangre o suero. Por lo tanto, por "multímeros de orden superior" nos referimos a multímeros más allá del homodímero que se forman en solución antes de su inyección en un sujeto así como multímeros más allá del homodímero que se forman *in vivo*.

"Actividades de modulación inmunitaria", "modulación de la respuesta inmunitaria", "modulación del sistema inmunitario", y "modulación inmunitaria" significa alterar los sistemas inmunitarios cambiando las actividades, capacidades y números relativos de una o más células inmunitarias, incluidas maduración de un tipo celular dentro de su tipo celular o en otros tipos celulares. Por ejemplo, la modulación inmunitaria de monocitos inmaduros puede conducir a mayores poblaciones de más monocitos maduros, células dendríticas, macrófagos u osteoclastos, todos los cuales proceden de monocitos inmaduros. Como otro ejemplo, la modulación inmunitaria de linfocitos B de memoria puede conducir a la apoptosis selectiva de determinados linfocitos B de memoria con reducción simultánea de producción de anticuerpos particulares. Como otro ejemplo, la modulación inmunitaria de linfocitos NK puede conducir a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos aumentada. Como otro ejemplo, actividades de modulación inmunitaria pueden conducir a poblaciones aumentadas de células con fenotipos que pueden, de otro modo, no expresarse en altos niveles, tales como linfocitos CD8 beta + / CD11c +. Como otro ejemplo, las actividades de modulación inmunitaria pueden conducir a disminuciones de citocinas proinflamatorias o citocinas que se encuentran comúnmente elevadas en enfermedades autoinmunitarias tales como IL-6 e IL-8. Como otro ejemplo, las actividades de modulación inmunitaria pueden conducir a la activación de linfocitos NKT con posterior secreción y escisión de TGF-beta. Por ejemplo, receptores de células inmunitarias se pueden unir mediante biomiméticos inmunológicamente activos y activar señalización intracelular para inducir diversos cambios en células inmunitarias, denominadas por separado como "modulación inmunitaria de activación". El bloqueo de receptores de células inmunitarias para evitar la activación del receptor también queda englobado dentro de "modulación inmunitaria" y puede denominarse por separado como "modulación inmunitaria inhibitoria".

La modulación de células dendríticas puede promover o inhibir la presentación de antígenos a linfocitos T, por ejemplo, mediante la inducción de la expresión de CD86 y/o CD1a sobre la superficie de células dendríticas. CD1a es una glicoproteína relacionada con la clase I de MHC que se expresa sobre la superficie de células presentadoras de antígeno, particularmente, en células dendríticas. CD1a está implicada en la presentación de antígenos lípidos a linfocitos T. CD86 también se expresa sobre la superficie de células presentadoras de antígenos y proporciona coestimulación a linfocitos T. CD86 es un ligando a tanto CD28 como CTLA-4 sobre la superficie de linfocitos T para enviar señales de activación e inhibitorias, respectivamente. Por lo tanto, el nivel de expresión de CD86 y sus receptores cognados, determina si se inducirá o no la toleración o respuesta inmunitaria específica. Las moléculas biomiméticas de la presente invención pueden ser capaces de modular la respuesta inmunitaria, en parte, induciendo la expresión de CD86 y CD1a sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos, particularmente, en células dendríticas.

La modulación de maduración de un monocito se refiere a la diferenciación de un monocito en una DC madura, un macrófago o un osteoclasto. La diferenciación puede modularse para acelerar la tasa o dirección de maduración y/o para aumentar el número de monocitos que se someten a diferenciación. Como alternativa, la diferenciación se puede reducir en términos de tasa de diferenciación y/o número de células que se someten a diferenciación.

El término polipéptido "aislado" o péptido tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido o un péptido que o bien no tiene un homólogo de origen natural o bien se ha separado o purificado de componentes que lo acompañan naturalmente, por ejemplo, en tejidos tales como páncreas, el hígado, bazo, ovario, testículos, músculo, tejidos articular, tejido neural, tejido gastrointestinal o tejido de mama o tejido tumoral (por ejemplo, tejido de cáncer de mama) o fluidos corporales tales como sangre, suero u orina. Por lo general, el polipéptido o péptido se considera "aislado" cuando está al menos al 70 %, en peso seco, libre de proteínas y otras moléculas de origen natural con el que se asocia naturalmente. Preferentemente, una preparación de un polipéptido (o péptido) de la invención es de al menos el 80 %, más preferentemente al menos un 90 %y, lo más preferentemente, al menos un 99 %, en peso seco, el polipéptido (péptido), respectivamente, de la invención. Puesto que un polipéptido o péptido que está sintetizado químicamente está, por su naturaleza, separado de los componentes que lo acompañan naturalmente, el polipéptido o péptido sintético está "aislado".

Un polipéptido (o péptido) aislado de la invención puede obtenerse, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural (por ejemplo, de tejidos o fluidos corporales); mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido o péptido; o mediante síntesis química. Un polipéptido o péptido que se produce en un sistema celular distinto de la fuente de la que se origina naturalmente está "aislado", puesto que estará necesariamente libre de componentes que lo acompañan naturalmente. El grado de aislamiento o pureza se puede medir mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis de gel de poliacrilamida o análisis HPLC.

Composiciones farmacéuticas

La administración de las composiciones descritas en el presente documento se realizará mediante cualquier vía

común, oral, parental o tópica. Vías a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, oral, nasal, bucal, rectal, vaginal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intratumoral, espinal, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, sublingual, oral mucosal, bronquial, linfática, intra-uterina, subcutánea, intratumoral, integrada sobre un dispositivo implantable tal como una sutura o en un dispositivo implantable tal como un polímero implantable, intradural, intracortical o dérmica. Tales composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables tal como se describe en el presente documento. En un enfoque preferente, la administración es por vía intravenosa o subcutánea.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células de la presente invención, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse en las composiciones principios activos complementarios.

Estas composiciones pueden formularse en una forma neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando molécula en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y criodeseado, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

Además, un enfoque proporciona una composición adecuada por su administración oral y se proporciona en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo debe ser asimilable o comestible e incluye vehículos líquidos, semisólidos, es decir, pastas, o sólidos. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial para el receptor o la eficacia terapéutica de una preparación contenida en el mismo, su uso en una composición administrable por vía oral para su uso en la práctica de los métodos de la presente invención es adecuado. Ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, cargas y similares o combinaciones de los mismos. El término "administración oral", como se usa en el presente documento, incluye la administración por vía oral, bucal, entérica o intragástrica.

En un enfoque, la composición se combina con el vehículo de cualquier modo conveniente y práctico, es decir, mediante solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulación, microencapsulación, absorción y similares. Tal procedimiento es habitual para los expertos en la técnica.

En una estrategia específica, la composición que se encuentra en forma de polvos se combina o mezcla exhaustivamente con un vehículo semisólido o sólido. El mezclado se puede llevar a cabo de cualquier modo conveniente tal como molienda. También se pueden añadir agentes estabilizantes en el proceso de mezclado para proteger la composición de la pérdida de la actividad terapéutica mediante, es decir, desnaturalización en el estómago. Ejemplos de estabilizantes para su uso en una composición administrable por vía oral incluyen tampones, antagonistas a la secreción de ácidos estomacales, aminoácidos tales como glicina y lisina, hidratos de carbono tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc., inhibidores de enzimas proteolíticas y similares. Más preferentemente, para una composición administrada por vía oral, el estabilizante también puede incluir antagonistas a la secreción de ácidos estomacales.

Además, la composición para su administración por vía oral que se combina con un vehículo semisólido o sólido puede formularse adicionalmente en cápsulas de gelatina de recubrimiento blando, comprimidos o píldoras. Más preferentemente, cápsulas de gelatina, comprimidos o píldoras se recubren entéricamente. Los recubrimientos entéricos previenen la desnaturalización de la composición en el estómago o en el intestino superior donde el pH es ácido. Véase, es decir, la Patente de EE.UU. n.º 5.629.001. Cuando alcanza los intestinos delgados, el pH básico en estos disuelve el recubrimiento y permite que la composición se libere para interactuar con las células intestinales, por ejemplo, células M de parche de Peyer.

En otro enfoque, la composición en forma de polvo se combina o mezcla exhaustivamente con materiales que crean una nanopartícula que encapsula el biomimético inmunológicamente activo o en la que se une el biomimético

inmunológicamente activo. Cada nanopartícula tendrá un tamaño inferior a o igual a 100 micrómetros. La nanopartícula puede tener propiedades mucoadhesivas que permiten la absorción gastrointestinal de un biomimético inmunológicamente activo que, de otro modo, no estaría biodisponible oralmente.

- 5 En otro enfoque, una composición en polvo se combina con un vehículo líquido tal como, es decir, agua o una solución salina, con o sin un agente estabilizante.

Una formulación específica que se puede usar es una solución de proteína biomimética inmunológicamente activa en un tampón a base de fosfato hipotónico que está libre de potasio donde la composición del tampón es del siguiente modo: 6 mM de monohidrato de fosfato de sodio monobásico, 9 mM de fosfato sódico dibásico heptahidrato, 50 mM de cloruro de sodio, pH 7,0. $\pm$ 0,1. La concentración de proteína biomimética inmunológicamente activa en un tampón hipotónico puede variar de 10 microgramos/ml a 100 miligramos/ml. Esta formulación puede administrarse mediante cualquier vía de administración, por ejemplo, pero sin limitación a administración intravenosa.

Además, una composición para su administración por vía tópica que se combina con un vehículo semisólido puede formularse adicionalmente en una crema o pomada en gel. Un vehículo preferente para la formación de una pomada en gel es un polímero en gel. Polímeros preferentes que se usan para fabricar una composición en gel de la presente invención incluyen, pero sin limitación a carbopol, carboximetilcelulosa y polímeros plurónicos. Específicamente, una composición de multímeros Fc en polvos se combina con un gel acuoso que contiene un agente de polimerización tal como Carbopol 980 a resistencia de entre el 0,5 % y el 5 % en peso/volumen para su aplicación a la piel para el tratamiento de una enfermedad o por debajo de la piel. El término "administración tópica", como se usa en el presente documento, incluye la aplicación a una superficie dérmica, epidérmica, subcutánea o mucosa.

Además, se puede formular una composición en un polímero para su implantación subcutánea o subdérmica. Una formulación preferente para el polímero infundido de fármaco implantable es un agente generalmente considerado como seguro y puede incluir, por ejemplo, dextrano reticulado (Samantha Hart, Master of Science Thesis, "Elution of Antibiotics from a Novel Cross-Linked Dextran Gel: Quantification" Virginia Polytechnic Institute and State University, 8 de junio de 2009) dextrano-tiramina (Jin, et al. (2010) Tissue Eng. Part A. 16(8):2429-40), dextrano-poli(etilenglicol) (Jukes, et al. (2010) Tissue Eng. Part A., 16(2):565-73), o dextrano-glutaraldehído (Brondsted, et al. (1998) J. Controlled Release, 53: 7-13). Un experto en la técnica conocerá que se pueden formar muchos polímeros e hidrogeles similares que incorporan la molécula fijada dentro del polímero o hidrogel y que controla el tamaño del poro al diámetro deseado.

Tras la formulación, las soluciones se administran de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz para dar como resultado una mejora o el remedio de los síntomas. Las formulaciones se administran fácilmente en varias formas farmacéuticas tales como soluciones ingeribles, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Se puede producir alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración puede, en cualquier caso, determinar la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones cumplen los estándares de esterilidad, seguridad general y pureza como se requiere por el Centro FDA de Evaluación Biológica y estándares de Investigación.

La vía de administración variará, naturalmente, con la ubicación y naturaleza de la enfermedad que está siendo tratada y puede incluir, por ejemplo, la administración intradérmica, transdérmica, subdérmica, parenteral, nasal, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intratumoral, perfusión, lavado, inyección directa y administración oral.

El término "administración parenteral" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier forma de administración en la que se absorbe el compuesto en el sujeto sin implicar la absorción vía los intestinos. Administraciones parenterales a modo de ejemplo que se usan en la presente invención incluyen, pero sin limitación a la administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, intraocular, nasal o intraarticular.

Además, la administración puede opcionalmente administrarse antes, durante o después de otro agente farmacéutico. Por ejemplo, se ha encontrado sorprendentemente que la administración simultánea de la molécula biomimética de la presente invención y prednisolona consigue efectos sinérgicos superiores que los observados o bien en la composición o la prednisolona solas (Véase Figura 3).

A continuación hay ejemplos específicos de diversas categorías de formulación farmacéutica y vías preferentes de administración, como se indica, para enfermedades a modo de ejemplo específicas:

Comprimido disoluble bucal o sublingual: angina, poliarteritis nodosa.

Intravenosa: púrpura trombocitopénica idiopática, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizante de IgM paraproteinémica, fascitis necrotizante, Pénfigo, gangrena, dermatomiositis, granuloma, Linfoma, septicemia,

anemia aplásica, fallo orgánico multisistema, mieloma múltiple o gammopatía monoclonal de significado desconocido, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, miopatías inflamatorias, púrpura trombocitopénica trombótica, miositis, Anemia, neoplasia, Anemia hemolítica, encefalitis, mielitis, mielopatía asociada especialmente con virus-1 linfotrófico de linfocitos T humanos, Leucemia, esclerosis múltiple y neuritis óptica, asma, necrólisis epidérmica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, neuropatía, uveítis, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de injerto frente a huésped, síndrome del hombre rígido, degeneración cerebelar paraneoplásica con anticuerpos anti-Yo, encefalomiелitis paraneoplásica y neuropatía sensorial con anticuerpos anti-Hu, vasculitis sistémica, lupus eritematoso sistémico, neuropatía diabética autoinmunitaria, neuropatía disautonómica idiopática aguda, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, neuropatía motora multifocal, síndrome de la neurona motora inferior asociado con anti-/GM1, desmielinización, glomerulonefritis membranoproliferativa, cardiomiopatía, enfermedad de Kawasaki, artritis reumatoide y síndrome de Evan IM - ITP, CIDP, MS, dermatomiositis, miastenia grave, distrofia muscular. La expresión "administración intravenosa" tal como se usa en el presente documento, incluye todas las técnicas para suministrar un compuesto o composición de la presente invención a la circulación sistémica mediante una inyección o infusión intravenosa.

Gel dérmico, loción, crema o parche: vitiligo, Herpes zóster, acné, queratitis.

Supositorio rectal, gel o infusión: colitis ulcerosa, inflamación hemorroidal.

Oral como píldora, trocisco, encapsulada con recubrimiento entérico: enfermedad de Crohn, celiaquía, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria del hígado, esófago de Barrett.

Intracortical: epilepsia, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, Enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington.

Infusión intraabdominal o implante: endometriosis.

Gel intravaginal o supositorio: bacterias, tricomonas o vaginitis fúngica.

Dispositivos médicos: recubierta sobre stent de arteria coronaria, articulaciones protésicas.

Las moléculas biomiméticas descritas en el presente documento puede administrarse en dosificaciones de aproximadamente 0,01 mg por kg a aproximadamente 300 mg por kg de peso corporal y, especialmente de 0,01 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal y puede administrarse al menos una vez al día, semanalmente, quincenalmente o mensualmente. Se puede usar un régimen de dosificación bifásico en donde la primera fase de dosificación comprende aproximadamente del 0,1 % a aproximadamente el 300 % de la segunda fase de dosificación.

Aplicaciones terapéuticas

Basándose en el diseño racional y en validaciones *in vitro* e *in vivo*, las moléculas biomiméticas de la presente invención servirán como importantes biofarmacéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y para modular la función inmunitaria en otros varios contextos tales como bioinmunoterapia para cáncer y enfermedades inflamatorias. Las afecciones médicas adecuadas para su tratamiento con los biomiméticos inmunológicamente activos descritos en la presente invención incluyen aquellos que se tratan habitualmente en la actualidad con hIVIG o en los que se ha encontrado que hIVIG es clínicamente útil tal como citopenias autoinmunitarias, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barre, miastenia grave, enfermedad autoinmunitaria de anti-factor VIII, dermatomiositis, vasculitis y uveitis (Véase, F. G. van der Meche, P. I. Schmitz, N. Engl. J. Med. 326, 1123 (1992); P. Gajdos et al, Lancet i, 406 (1984); Y. Sultan, M. D. Kazatchkine, P. Maisonneuve, U. E. Nydegger, Lancet ii, 765 (1984); M. C. Dalakas et al., N. Engl. J. Med. 329, 1993 (1993); D. R. Jayne, M. J. Davies, C. J. Fox, C. M. Black, C. M. Lockwood, Lancet 337, 1137 (1991); P. LeHoang, N. Cassoux, F. George, N. Kullmann, M. D. Kazatchkine, Ocul. Immunol. Inflamm. 8, 49 (2000)) y aquellos cánceres o afecciones de enfermedades inflamatorias en las que se puede usar un anticuerpo monoclonal o ya está en uso clínico. Las afecciones incluidas entre esas que pueden tratarse eficazmente por los compuestos que son el objeto de la presente invención incluyen una enfermedad inflamatoria con un desequilibrio en las redes de citoquinas, un trastorno autoinmunitario mediado por autoanticuerpos patogénicos o linfocitos T autoagresivos o una fase aguda o crónica de una enfermedad o proceso autoinmunitario que reaparece crónico, inflamatorio o infeccioso.

Además, otras afecciones médicas que tienen un componente inflamatorio se beneficiarán del tratamiento tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Infarto de miocardio, Stroke, Hepatitis B, Hepatitis C, inflamación asociada a virus de inmunodeficiencia humana, adrenoleucodistrofia y trastornos epilépticos especialmente aquellos que se piensa que están asociados con encefalitis postviral que incluyen síndrome de Rasmussen, síndrome de West y síndrome de Lennox-Gastaut.

En enfoque general a la terapia mediante el uso de moléculas biomiméticas aisladas descrito en el presente documento es administrar al sujeto que tiene una enfermedad o afección, una cantidad terapéuticamente eficaz del

biomimético inmunológicamente activo aislado para efectuar un tratamiento. En algunas realizaciones, las enfermedades o afecciones pueden categorizarse ampliamente como enfermedades inflamatorias con un desequilibrio en las redes de citoquinas, un trastorno autoinmunitario mediado por autoanticuerpos patogénicos o linfocitos T autoagresivos o una fase aguda o crónica de una enfermedad o proceso que reaparece.

El término "que trata" y "tratamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a la administración a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biomimética de la presente invención de modo que el sujeto tiene una mejora en una enfermedad o afección, o un síntoma de la enfermedad o afección. La mejora es cualquier mejora o remedio de la enfermedad o afección, o síntoma de la enfermedad o afección. La mejora es una mejora observable o medible o puede ser una mejora en la sensación general o bienestar del sujeto. Por lo tanto, un experto en la técnica se da cuenta que un tratamiento puede mejorar la condición de la enfermedad, pero no puede ser una cura completa de la enfermedad. Específicamente, las mejoras en los sujetos pueden incluir uno o más de: inflamación reducida; marcadores de laboratorio inflamatorios reducidos tales como proteína reactiva C; autoinmunidad reducida como se evidencia mediante uno o más de: mejoras en marcadores autoinmunitarios tales como autoanticuerpos o en el recuento plaquetario, recuento de glóbulos blancos o recuento de glóbulos rojos, púrpura o erupción reducida, reducción en debilidad, entumecimiento, o cosquilleo, niveles de glucosa aumentados en pacientes con hiperglicemia, dolor articular, inflamación, hinchazón o degradación reducidas, reducción en la frecuencia y volumen de calambres y diarrea, angina reducida, inflamación de tejido reducida, o reducción en la frecuencia de crisis; reducción en la carga de tumores del cáncer, tiempo hasta la progresión tumoral aumentado, dolor del cáncer reducido, supervivencia aumentada o mejoras en la calidad de vida; o retraso en la progresión o mejora de la osteoporosis.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que da como resultado una mejora o remedio de los síntomas de la enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, "profilaxis" puede significar la completa prevención de los síntomas de una enfermedad, un retraso en la aparición de los síntomas de una enfermedad o una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad posteriormente desarrollados.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se entiende que significa cualquier sujeto mamífero al que se administran las moléculas biomiméticas de la presente invención de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En una realización específica, los métodos de la presente divulgación se emplean para tratar un sujeto humano. Los métodos de la presente divulgación pueden emplearse también para tratar primates no humanos (por ejemplo, monos, babuínos y chimpancés), ratones, ratas, bovinos, caballos, gatos, perros, cerdos, conejos, cabras, ciervo, oveja, hurones, jerbos, cobayas, hamsters, murciélagos, pájaros, pollos, pavos y patos), peces y reptiles para producir moléculas de estradiol específicas de especie o quiméricas.

En particular, las moléculas biomiméticas de la presente invención se pueden usar para tratar afecciones que incluyen aunque no de forma limitante insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de médula ósea; pérdida ósea; enfermedad de Paget, osteoclastoma; mieloma múltiple; cáncer de mama; osteopenia por desuso; desnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhans, lesión de la médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monoostótica, displasia fibrosa polioestótica, reconstrucción periodontal, y fracturas óseas; sarcoidosis; cánceres óseos osteolíticos, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer rectal; metástasis ósea, gestión del dolor óseo, e hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de trasplantes, infecciones víricas, neoplasias hematológicas y afecciones similares a neoplasias, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no de Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmática), tumores de células precursoras de linfocitos, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T, timoma, tumores de los linfocitos T y NK maduros, incluyendo leucemias de linfocitos T periféricos, leucemia de linfocitos T adultos/linfomas de linfocitos T y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides, tales como leucemias mielógenas, incluyendo AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos, y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo, tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma, y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer de páncreas, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer de testículo, cánceres uterinos, vaginales o cervicales, cáncer de ovarios, cáncer de hígado primario o cáncer de endometrio, tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma)) u otro cáncer.

"Cáncer" en el presente documento se refiere a o describe la afección fisiológica en mamíferos que está caracterizada normalmente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluido liposarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, fibrosarcoma,

- mixosarcoma, condrosarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, cordoma, sinovioma, schwanoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y
- 5 carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal,
- 10 carcinoma del pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, tumor de Ewing, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, Macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad mielodisplásica, enfermedad de la cadena pesada, tumores neuroendocrinos, Schwannoma y otros carcinomas, así como cáncer de cabeza y cuello.
- 15
- 20 Las moléculas biomiméticas de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias. El término "enfermedad autoinmunitaria" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo variado de más de 80 enfermedades y afecciones. En todas estas enfermedades y afecciones, el problema subyacente es que el sistema inmune del organismo ataque al organismo propio. Las enfermedades autoinmunitarias afectan a todos los sistemas orgánicos principales que incluyen tejido conectivo, nervios, músculos, sistema endocrino, piel, sangre y los
- 25 sistemas respiratorias y gastrointestinales. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, y diabetes de tipo 1.
- La enfermedad o afección tratable usando las composiciones y métodos puede ser un proceso hematológico, incluyendo, pero sin limitación púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia aloinmunitaria/autoinmunitaria,
- 30 trombocitopenia inmunitaria adquirida, neutropenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmune, aplasia de glóbulos rojos asociada al parvovirus B19, autoinmunidad anti-factor VIII adquirida, enfermedad de von Willebrand adquirida, mieloma múltiple o gammopatía monoclonal de significado desconocido, septicemia, anemia aplásica, aplasia pura de glóbulos rojos, anemia de Diamond-Blackfan, enfermedad hemolítica del neonato, neutropenia mediada por inmunidad, refractariedad a la transfusión de plaquetas, púrpura post-transfusión neonatal, síndrome urémico hemolítico, vasculitis sistémica, púrpura trombocitopénica trombótica, o síndrome de Evan.
- 35
- La enfermedad o afección también puede ser un proceso neuroinmunológico, incluyendo, pero sin limitación, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante de IgM paraproteinémica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, neuropatía motora multifocal, síndrome de la neurona motora inferior asociado con anti-GM1, desmielinización, esclerosis múltiple y neuritis óptica, síndrome del hombre rígido, degeneración cerebelar paraneoplásica con anticuerpos anti-Yo, encefalomiелitis paraneoplásica, neuropatía sensorial con anticuerpos anti-Hu, epilepsia, encefalitis, mielitis, mielopatía asociada especialmente con virus-1 linfotrófico de linfocitos T humanos, neuropatía diabética autoinmunitaria, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington o neuropatía disautonómica idiopática aguda.
- 40
- La enfermedad o afección también puede ser un proceso patológico reumático, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Kawasaki, artritis reumatoide, síndrome de Felty, vasculitis positiva a ANCA, polimiositis espontánea, dermatomiositis, síndromes antifosfolípido, abortos espontáneos recurrentes, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, síndrome de Raynaud, síndrome de CREST, o uveítis.
- 45
- La enfermedad o afección también puede ser un proceso patológico dermatoinmunológico, incluyendo, pero sin limitación, necrólisis epidérmica tóxica, gangrena, granuloma, enfermedades de la piel con ampollas autoinmunitarias, incluyendo pénfigo vulgar, penfigoide buloso, pénfigo foliáceo, vitiligo, síndrome de choque tóxico estreptocócico, esclerodermia, escleroderma, esclerosis sistémica, incluyendo esclerosis sistémica cutánea difusa y limitada, o dermatitis atópica (especialmente dependiente de esteroides).
- 50
- La enfermedad o afección también puede ser un proceso patológico inmunológico musculoesquelético, incluyendo, pero sin limitación, miositis por cuerpos de inclusión, fascitis necrotizante, miopatías inflamatorias, miositis, miopatía anti-decorin (antígeno BJ), miopatía necrótica paraneoplásica, miopatía vacuolada ligada a X, polimiositis inducida por penicilamina, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, o cardiomiopatía.
- 60
- La enfermedad o afección también puede ser un proceso patológico inmunológico gastrointestinal, incluyendo, pero sin limitación, anemia perniciosa, hepatitis crónica activa autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme, cirrosis criptogénica, artritis reactiva, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, colitis ulcerosa, o colangitis esclerosante.
- 65

La enfermedad o afección también puede ser enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de injerto mediado por anticuerpos, rechazo después de trasplante de médula ósea, enfermedad inflamatoria post-infecciosa, linfoma, leucemia, neoplasia, asma, diabetes mellitus de tipo 1 con anticuerpos anti-células beta, síndrome de Sjögren, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Addison, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, micropoliarteritis, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa o fallo orgánico multisistémico.

En otro enfoque, los biomiméticos inmunológicamente activos descritos en el presente documento podrían usarse en un sistema de cebado en el que se extrae sangre de un paciente y se pone en contacto de manera transitoria con la(s) molécula(s) durante un periodo de tiempo desde aproximadamente media hora a aproximadamente tres horas antes de volver a introducirse en el paciente. En esta forma de terapia celular, se exponen las propias células efectoras del paciente a la molécula que está fijada en una matriz ex vivo para modular las células efectoras mediante la exposición de las células efectoras a la molécula. La sangre, que incluye las células efectoras moduladas, se vuelve a infundir al paciente. Dicho sistema de cebado podría tener numerosas aplicaciones clínicas y terapéuticas.

Las moléculas biomiméticas que se desvelan en el presente documento también se pueden aplicar fácilmente para alterar las respuestas del sistema inmunitario en varios contextos para afectar cambios específicos en perfiles de respuesta inmunitaria. La alteración o modulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto se refiere al aumento, reducción o cambio de la relación o componentes de una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la producción de citoquinas o niveles de secreción puede aumentarse o reducirse según se desee dirigiendo la combinación adecuada de FcRs con una molécula biomimética designada para interactuar con esos receptores. La producción de anticuerpos también se puede aumentar o reducir; la relación de dos o más citoquinas o receptores de células inmunitarias puede cambiarse; o se puede provocar la producción de tipos adicionales de citoquinas o anticuerpos. La respuesta inmunitaria también puede ser una función efectora de una célula inmunitaria que expresa un FcγR, que incluye potencial fagocítico aumentado o reducido de células procedentes de macrófagos de monocitos, función de osteoclasto aumentada o reducida, presentación de antígenos aumentada o reducida por células presentadoras de antígenos (por ejemplo, DC), función de linfocitos NK aumentada o reducida, función de linfocitos B aumentada o reducida, en comparación con una respuesta inmunitaria que no se modula por una biomimético inmunológicamente activo en el presente documento.

En un enfoque preferente, un sujeto con cáncer o una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria tiene su respuesta inmunitaria alterada que comprende la etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biomimética descrita en el presente documento al sujeto, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biomimética altera la respuesta inmunitaria en el sujeto. Idealmente, esta intervención trata la enfermedad o afección del sujeto. La respuesta inmunitaria alterada puede ser una respuesta aumentada o reducida y puede implicar niveles de citoquinas alterados que incluyen los niveles de cualquiera de IL-6, IL-10, IL-8, IL-23, IL-7, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, TNF-alfa y IFN-alfa. En una realización preferida, IL-6 o IL-8 disminuyen en respuesta a la terapia. En una realización especialmente preferente, IL-6 e IL-8 disminuyen en respuesta a la terapia. Sin embargo, la invención no está limitada a cualquier mecanismo de acción particular de los biomiméticos descritos. La respuesta inmunitaria alterada puede ser un nivel alterado de autoanticuerpos en el sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser un nivel alterado de linfocitos T autoagresivos en el sujeto.

Por ejemplo, la reducción de la cantidad de producción de TNF-alfa en enfermedades autoinmunitarias puede tener efectos terapéuticos. Una estrategia práctica de esto es la terapia de anticuerpos anti-TNF-alfa (por ejemplo, REMICADE®) que está clínicamente probada para tratar la psoriasis en placas, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y espondilitis anquilosante. Estas enfermedades autoinmunitarias tienen distintas etiologías, pero comparten componentes inmunológicos clave de los procesos patológicos relacionados con la inflamación y la actividad de células inmunitarias. Un estradómero diseñado para reducir la producción de TNF-alfa será igualmente eficaz en estas y muchas otras enfermedades autoinmunitarias. El perfil de respuesta inmunitaria alterada también puede ser la modulación directa o indirecta para efectuar una reducción en la producción de anticuerpo, por ejemplo, autoanticuerpos que se dirigen a los tejidos propios de un sujeto, o niveles alterados de linfocitos T autoagresivos en el sujeto. Por ejemplo, la esclerosis múltiple es un trastorno autoinmunitario que implica linfocitos T autorreactivos que puede tratarse con terapia de interferón beta. Véase, por ejemplo, Zafranskaya M, et al., Interferon-beta therapy reduces CD4+ and CD8+ T-cell reactivity in multiple sclerosis, *Immunology*, mayo de 2007;121(1):29-39-Epub 18 de diciembre de 2006. Un diseño de estradómero para reducir los niveles de linfocitos T autorreactivos será igualmente eficaz en la esclerosis múltiple y muchas otras enfermedades autoinmunitarias que impliquen linfocitos T autorreactivos.

Las moléculas biomiméticas descritas en el presente documento pueden usarse para modular la expresión de moléculas coestimulantes de una célula inmunitaria, incluida una célula dendrítica, un macrófago, un osteoclasto, un monocito o un linfocito NK o para inhibir en estas mismas células inmunitarias la diferenciación, maduración o secreción de citoquinas, incluida interleucina-12 (IL-12), o de aumentar la secreción de citocinas, incluyendo interleucina-10 (IL-10), o interleucina-6 (IL-6). Un experto en la materia también puede validar la eficacia de un biomimético inmunológicamente activo exponiendo a una célula inmunitaria al biomimético inmunológicamente activo

y midiendo la modulación de la función de la célula inmunitaria, en la que la célula inmunitaria es una célula dendrítica, un macrófago, un osteoclasto, o un monocito. En un enfoque, se expone la célula inmunitaria al biomimético inmunológicamente activo *in vitro* y comprende además la etapa de determinar una cantidad de un receptor de la superficie celular o de la producción de una citocina, en el que un cambio en la cantidad de receptor de la superficie celular o de la producción de citocinas indica una modulación de la función de la célula inmunitaria. En otro enfoque, la célula inmunitaria se expone al biomimético inmunológicamente activo *in vivo* en un modelo animal para una enfermedad autoinmunitaria que comprende una etapa de evaluar un grado de mejora de la enfermedad autoinmunitaria.

10 Métodos que emplean Fc fijos

Para entender el papel de las interacciones de Fc: receptor Fc gamma (FcγR, el receptor Fc para Fc de IgG) y la importancia para la función de hIVIG de que su Fc esté inmovilizado biológicamente en una inmunoglobulina, se compararon los efectos de hIVIG tanto con una forma fija de un fragmento Fc de IgG1 recombinante (rFCF) y una forma soluble de un fragmento Fc de IgG1 recombinante (sFc) que contiene los dominios bisagra-CH2-CH3 en la función de monocitos durante el proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDC).

La exposición de monocitos cultivados con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina-4 (IL-4), a rFCF inmovilizado y a hIVIG inmovilizado, pero no a bajas dosis de hIVIG soluble, potenció la expresión de CD86, retrasó la expresión de CD11c, y suprimió la expresión de CD11a en las células. Además, es probable que estos cambios no sean secundarios a la inmovilización no específica de proteína del rFCF sobre plástico, ya que hIVIG soluble agregada por calor (sHA), sHA rFCF o hIVIG a alta dosis (que se reconoce que contiene Fc multiméricos), indujeron cambios similares a aquellos observados con rFCF inmovilizado.

Tomados en conjunto, nuestros datos indican que la exposición de iDC a hIVIG inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido, semisólido, o gelatinoso da como resultado una población única de DC (alto CD86, bajo CD11a), capaz de orquestar tolerancia inmunitaria, y que las moléculas inmovilizadas que incluyen la porción funcional de fragmentos Fc de inmunoglobulina G (IgG) pueden ser útiles como miméticos de hIVIG para el tratamiento de inflamación local y sistémica, así como una gran variedad de otras afecciones patológicas que están, directa o indirectamente, mediadas por células derivadas de monocitos (MDC), tales como iDC. Además, la inmovilización de la porción funcional de Fc de IgG sobre dispositivos, descritos en el presente documento como "dispositivos de recubrimiento", que se implantan en los organismos o se acoplan a los cuerpos de animales (por ejemplo, pacientes humanos) con moléculas que contienen la porción funcional del fragmento Fc de IgG puede aminorar, si no prevenir, las respuestas inflamatorias a tales dispositivos o tratar enfermedades sistémicas afectando células inmunitarias que a continuación, pasan a la circulación, que han sido alteradas por el contacto con la molécula biomimética fijada recubierta sobre o en el dispositivo implantado.

La divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de una célula procedente de monocitos (MDC). El método incluye poner en contacto la célula con una composición que comprende un sustrato con un reactivo de Fc unido al mismo. La puesta en contacto puede ser *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Como alternativa, la célula puede encontrarse en un animal. El animal puede ser uno que tenga, o esté en riesgo de desarrollar, una afección mediada por células derivadas de monocitos (MDCMC). La MDC puede ser, por ejemplo, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, o un osteoclasto.

La divulgación también proporciona un método de tratamiento o profilaxis. El método incluye administrar a un animal una composición que contiene un sustrato que tiene un reactivo de Fc unido a éste, siendo el animal uno que tenga o esté en riesgo de desarrollar una MDCMC.

También es posible que las moléculas biomiméticas de la presente invención lleven a un reactivo Fc fijado *in vivo*. Por "reactivo Fc fijado *in vivo*" nos referimos a Fc fijado a la superficie de células, por ejemplo, plaquetas, *in vivo*. Se ha observado que las plaquetas que expresan FcγR están eficazmente recubiertas con las moléculas biomiméticas de la presente invención y que estas plaquetas inducen tolerancia en un organismo hasta que se limpian. Las moléculas biomiméticas de la presente invención se ha observado sorprendentemente que se unen eficazmente al porcentaje de plaquetas que expresan FcγR. Como ova: complejos agregados de anti-ova y complejos de agregados RBC:anti-RBC inducen tolerancia y previenen la destrucción de plaquetas en ITP, estas plaquetas recubiertas pueden inducir tolerancia en un organismo. Esto puede ser otro mecanismo mediante el cual las moléculas biomiméticas de la presente invención ejercen sus funciones de modulación inmunitaria.

Basándose en la mucho mayor afinidad de unión a receptores Fc gamma de la molécula biomimética en comparación con el Fc de inmunoglobulina nativa contenido dentro de la molécula biomimética, también es posible que las moléculas biomiméticas de la presente invención lleven a un reactivo de control Fc de inmunoglobulina fijado *in vivo*. Por "reactivo de control Fc de inmunoglobulina fijado *in vivo*" nos referimos a molécula biomimética fijada a la superficie de células, incluyendo, pero sin limitación a monocitos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos T reguladores, linfocitos T gamma delta y plaquetas, *in vivo*. Mediante la unión a receptores de superficie celular incluidos receptores Fc gamma, las moléculas biomiméticas de la invención bloquean otras inmunoglobulinas de que se unan a estos receptores. Los anticuerpos monoclonales y policlonales se usan en ensayos de investigación tales

como citometría de flujo y diagnósticos clínicos. Un aspecto importante de la presente invención es la prevención de unión no específica por el componente Fc de estos anticuerpos a receptores Fc gamma y otros receptores de superficie celular a la que se puede unir Fc de inmunoglobulina.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "afección mediada por células derivadas de monocitos (MDCMC)" se refiere a una afección patológica que se debe directa o indirectamente, parcial o completamente, a la actividad de, o a factores producidos por, células derivadas de monocitos. Las células derivadas de monocitos incluyen, pero sin limitación, monocitos, macrófagos, células dendríticas interdigitantes (citadas generalmente en el presente documento como "células dendríticas" que comprenden células similares a las dendríticas y células
10 similares a las dendríticas foliculares) (maduras e inmaduras), osteoclastos, células similares a la microglía, células similares a las de islote productoras de insulina derivadas de monocitos, mastocitos inmaduros derivados de monocitos y micropartículas derivadas de monocitos.

- Como se aplica a Fc fijado, el término "sustrato" se refiere a un objeto sólido, semisólido o gelatinoso. El sustrato puede implantarse en, o unirse (o adherirse) a la superficie de, el cuerpo de un animal. El sustrato puede incluir, por ejemplo, componentes líquidos o gaseoso pero al menos una porción del sustrato es sólido, semisólido o gelatinoso. Por lo tanto, un sustrato puede ser una sustancia que es sustancialmente insoluble en disolvente acuoso pero soluble en un disolvente no acuoso. Tales sustancias incluyen lípidos (por ejemplo, fosfolípidos), ácidos grasos, y otros compuestos liposolubles, insolubles en disolventes acuosos. A partir de esto, será evidente que los sustratos incluyen liposomas. El sustrato puede ser poroso o no poroso. En determinados enfoques, el sustrato es inerte para la superficie y/o el organismo en el que se implanta, une, o adhiere.

- El sustrato puede contener o estar hecho de un polímero sintético, por ejemplo, nailon, Teflón, dacron, cloruro de polivinilo, PEU (poli (éster uretano)), PTFE (politetrafluoroetileno), PMMA (metil metacrilato) PEEK, elastómeros termoplásticos, polímeros radiopacos, polietersulfona, silicios, policarbonatos, poliuretanos, poliisobutileno y sus copolímeros, poliésteres, poliolefinas, poliisobutileno, copolímeros de etileno-alfaolefina, polímeros y copolímeros acrílicos, polímeros de haluro de vinilo y copolímeros tales como cloruro de polivinilo, éteres de polivinilo, polivinilmetiléter, haluros de polivinilideno, fluoruro de polivinilideno, cloruro de polivinilideno, poliacrilonitrilo, polivinilcetonas, aromáticos de polivinilo, poliestireno, ésteres de polivinilo, poli(acetato de vinilo), copolímeros de monómeros de vinilo, copolímeros de monómeros de vinilo y olefinas, copolímeros de etileno-metacrilato de metilo, copolímeros de acrilonitrilo-estireno, resinas ABS, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, poliamidas, Nailon 66, policaprolactona, resinas alquídicas, polioxietilenos, poliimidas, poliéteres, resinas epoxi, rayón-triacetato, celulosa, acetato de celulosa, butirato de celulosa, butirato acetato de celulosa, celofán, nitrato de celulosa, propionato de celulosa, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa, colágenos, quitinas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico-óxido de polietileno, polisiloxanos, polisiloxanos sustituidos, copolímeros de etileno vinil acetato, elastómeros de poliolefina y cauchos de EPDM y combinaciones de los mismos.

- El sustrato también puede contener o estar fabricado de un metal o una aleación de metal, por ejemplo, acero inoxidable, platino, iridio, titanio, tantalio, aleación de níquel-titanio y aleación de cobalto-cromo. Además, el sustrato también puede ser o incluir un tejido animal o producto de tejido animal, por ejemplo, un injerto de tejido u órgano. El tejido animal puede ser, por ejemplo, hueso (por ejemplo, hueso osteogénico) o cartílago. Además, el sustrato puede contener una proteína, por ejemplo, colágeno o queratina. El sustrato también puede ser o contener una matriz tisular, por ejemplo, una matriz tisular acelular. Las matrices acelulares en partículas o no en partículas se describen detalladamente en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.336.616 y 6.933.326. El sustrato también puede ser o
45 incluir una célula animal (por ejemplo, células reparadoras de tejidos, tales como fibroblastos; células madre mesenquimales) y puede ser, por ejemplo, un trasplante de unidad folicular. El sustrato puede contener o ser un polisacárido, por ejemplo, agarosa. También puede contener o ser una sal, preferentemente una sal relativamente insoluble, por ejemplo, sulfato de calcio. El sustrato puede ser un gel o una crema. Además, puede contener silicona o silástico. Los sustratos también pueden contener una fibra natural, por ejemplo, seda, algodón, o lana.

- Además, el sustrato puede ser un dispositivo médico implantable. Puede estar, por ejemplo, un stent (por ejemplo, un stent vascular, tal como un stent de la arteria coronaria; un stent de las vías aéreas, tal como un stent endotraqueal o nasal; un stent gastrointestinal, tal como un stent biliar o pancreático; o un stent urinario, tal como un stent ureteral) o una sutura quirúrgica (por ejemplo, una seda trenzada, tripa cromada, nailon, plástico, o una estructura metálica) o un clip quirúrgico (por ejemplo, un clip de aneurisma). El sustrato puede ser, por ejemplo, una cadera artificial, una articulación artificial de la cadera, una rodilla artificial, una articulación artificial de rodilla, un hombro artificial, una articulación artificial de hombro, una articulación artificial de un dedo de la mano o del pie, una placa ósea, una clavija ósea, un implante óseo no de unión, un implante de disco intervertebral, cemento óseo, o un espaciador de cemento óseo. Puede ser también una derivación arteriovenosa, un alambre implantable, un marcapasos, un corazón artificial, un dispositivo de asistencia cardíaca, un implante coclear, un desfibrilador implantable, un estimulador de la médula espinal, un estimulador del sistema nervioso central, o un implante de sistema nervioso periférico. Otros sustratos son prótesis dentales o coronas dentales.

- En otros enfoques, el sustrato puede ser un dispositivo o jaula de filtrado de émbolos de grandes vasos, un dispositivo percutáneo, un parche dérmico o subdérmico, o un dispositivo de administración de fármaco implantable. El sustrato también puede ser un injerto de un gran vaso sanguíneo, en el que el vaso sanguíneo es, por ejemplo,

una arteria carótida, una arteria femoral, o una aorta. Además, el sustrato puede ser un implante subdérmico, un implante de córnea, una lente intraocular o una lente de contacto.

El sustrato puede estar en forma de una lámina, una perla, una malla, una partícula de polvo, un filamento, una perla, o una fibra. También puede incluir o ser una sustancia sólida, semisólida o gelatinosa.

El sustrato también puede ser una célula que expresa FcγR. Preferentemente, el sustrato es una plaqueta.

Polímeros útiles en la invención son preferentemente esos que son bioestables, biocompatibles, particularmente durante la inserción o implante del dispositivo en el organismo y evitar la irritación del tejido corporal.

Los reactivos Fc pueden recubrirse (es decir, fijarse o estabilizarse) sobre sustratos en cualquiera de varios modos. Por ejemplo, pueden recubrirse directamente sobre la superficie de sustratos donde permanecen unidos por, por ejemplo, interacciones hidrófobas. A continuación se describen algunas otras metodologías ((a) - (e)) que implican el uso de polímeros:

(a) El reactivo Fc se mezcla con una mezcla de polímero miscible que después se extiende a modo de lámina sobre la superficie del material sintético implantable, estabilizando de este modo el reactivo de Fc. Los monómeros usados rutinariamente en la técnica para producir mezclas de polímeros incluyen PLMA [poli(metacrilato de laurilo)]; PEG [polietilenglicol], PEO [óxido de polietileno]; los polímeros de metacrilato funcionalizados con alquilo PMMA, PEMA, PPMA, y PBMA; itaconatos; fumaratos; y estirénicos.

(b) Se adhiere una capa de revestimiento polimérico inferior o una película de dimensiones nanométricas a la superficie del sustrato y después se adhiere el reactivo de Fc a la capa de recubrimiento polimérico inferior o a la película de dimensiones nanométricas, estabilizando de este modo el reactivo de Fc.

(c) Se aplica una fina capa de un polímero a la superficie del sustrato implantable y después se hace polimerizar el monómero. Tales monómeros incluyen, por ejemplo, metano, tetrafluoroetileno, benceno, metanol, óxido de etileno, tetraglima, ácido acrílico, alilamina, metacrilato de hidroxietilo, N-vinil pirrolidona, y mercaptoetanol. Entonces se une el reactivo de Fc al monómero resultante.

(d) El sustrato se recubre con una proteína, tal como proteína A o albúmina que se une al reactivo de Fc, estabilizando de este modo el Fc a la superficie del sustrato.

(e) El reactivo Fc puede marcarse con una cadena de aminoácidos hidrófoba que se une a materiales sintéticos implantables y hace que el Fc estabilizado se oriente de manera uniforme.

Cuando los Fc fijados son dispositivos implantables recubiertos con reactivos Fc, pueden implantarse en, unirse a o adherirse a órganos o tejido interno relevante o superficies corporales de sujetos relevantes mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Cuando se formulan como, por ejemplo, suspensiones, polvos, pueden formularse y administrarse como se ha descrito anteriormente para los estradómeros.

Los reactivos Fc fijados de la presente divulgación pueden usarse para tratar o prevenir afecciones que incluyen pero no limitadas a cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de médula ósea; pérdida ósea; enfermedad de Paget, formación de hueso hipertrófico; osteopenia por desuso; desnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Fangerhans, lesión de la médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monoostótica, displasia fibrosa polioostótica, reconstrucción periodontal, y fracturas óseas, gestión del dolor óseo, e hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de trasplantes e infecciones víricas.

Todas las enfermedades autoinmunitarias pueden ser en parte o en su totalidad una MDCMD. El término "enfermedad autoinmunitaria" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo variado de más de 80 enfermedades crónicas. En todas estas enfermedades, el problema subyacente es que el sistema inmune del organismo ataque al organismo propio. Las enfermedades autoinmunitarias afectan a todos los sistemas orgánicos principales que incluyen tejido conectivo, nervios, músculos, sistema endocrino, piel, sangre y los sistemas respiratorias y gastrointestinales.

La enfermedad autoinmunitaria puede ser un proceso hematoinmunológico, incluyendo, pero sin limitación púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia aloinmunitaria/autoinmunitaria, trombocitopenia inmunitaria adquirida, neutropenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmune, aplasia de glóbulos rojos asociada al parvovirus B19, autoinmunidad anti-factor VIII adquirida, enfermedad de von Willebrand adquirida, mieloma múltiple o gammopatía monoclonal de significado desconocido, septicemia, anemia aplásica, aplasia pura de glóbulos rojos, anemia de Diamond-Blackfan, enfermedad hemolítica del neonato, neutropenia mediada por inmunidad, refractariedad a la transfusión de plaquetas, púrpura post-transfusión neonatal, síndrome urémico hemolítico, vasculitis sistémica, púrpura trombocitopénica trombótica, o síndrome de Evan.

La enfermedad autoinmunitaria puede ser un proceso neuroinmunológico, incluyendo, pero sin limitación, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante de IgM

paraproteinéica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, neuropatía motora multifocal, síndrome de la neurona motora inferior asociado con anti-/GMI, desmielinización, esclerosis múltiple y neuritis óptica, síndrome del hombre rígido, degeneración cerebelar paraneoplásica con anticuerpos anti-Yo, encefalomiелitis paraneoplásica, neuropatía sensorial con anticuerpos anti-Hu, epilepsia, encefalitis, mielitis, mielopatía asociada especialmente con virus-1 linfotrófico de linfocitos T humanos, neuropatía diabética autoinmunitaria o neuropatía disautonómica idiopática aguda.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico reumático, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Kawasaki, artritis reumatoide, síndrome de Felty, vasculitis positiva a ANCA, polimiositis espontánea, dermatomiositis, síndromes antifosfolípido, abortos espontáneos recurrentes, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, síndrome de Raynaud, síndrome de CREST, o uveitis.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico dermatoinmunológico, incluyendo, pero sin limitación, necrólisis epidérmica tóxica, gangrena, granuloma, enfermedades de la piel con ampollas autoinmunitarias, incluyendo pénfigo vulgar, pénfigoide bulloso, y pénfigo foliáceo, vitiligo, síndrome de choque tóxico estreptocócico, esclerodermia, escleroderma, esclerosis sistémica, incluyendo esclerosis sistémica cutánea difusa y limitada, o dermatitis atópica (especialmente dependiente de esteroides).

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico inmunológico musculoesquelético, incluyendo, pero sin limitación, miositis por cuerpos de inclusión, fascitis necrotizante, miopatías inflamatorias, miositis, miopatía anti-decorin (antígeno BJ), miopatía necrótica paraneoplásica, miopatía vacuolada ligada a X, polimiositis inducida por penacilamina, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, o cardiomiopatía.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico inmunológico gastrointestinal, incluyendo, pero sin limitación, anemia perniciosa, hepatitis crónica activa autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme, cirrosis criptogénica, artritis reactiva, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, colitis ulcerosa, o colangitis esclerosante.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de injerto mediado por anticuerpos, rechazo después de trasplante de médula ósea, inflamación patológica post-infecciosa, linfoma, leucemia, neoplasia, asma, diabetes mellitus de tipo 1 con anticuerpos anti-células beta, síndrome de Sjögren, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Addison, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, micropoliarteritis, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa o fallo orgánico multisistémico.

"Cáncer" en el presente documento se refiere a o describe la afección fisiológica en mamíferos que está caracterizada normalmente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluido liposarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, leiomiomasarcoma, rabiomiomasarcoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, condrosarcoma), osteoclastoma, tumores neuroendocrinos, mesotelioma, cordoma, sinovioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, tumor de Ewing, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, Macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad mielodisplásica, enfermedad de la cadena pesada, tumores neuroendocrinos, Schwannoma y otros carcinomas, cáncer de cabeza y cuello, neoplasias mieloides, tales como leucemias mielógenas, incluyendo AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos, y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo, tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma, y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer de páncreas, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer de testículo, cánceres uterinos, vaginales o cervicales, cáncer de ovarios, cáncer de hígado primario o cáncer de endometrio, tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), neoplasias hematológicas y afecciones similares a neoplasias, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no de Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico

pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmacítica), tumores de células precursoras de linfocitos, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T, timoma, tumores de los linfocitos T y NK maduros, incluyendo leucemias de linfocitos T periféricos, leucemia de linfocitos T adultos/linfomas de linfocitos T y leucemia linfocítica granular grande, cánceres óseos osteolíticos y metástasis ósea.

Como se usa en el presente documento, un sujeto "en riesgo de desarrollar una enfermedad mediada por células derivadas de monocitos (MDCMD)" es un sujeto que tiene una predisposición para desarrollar la MDCMD, es decir, una predisposición genética para desarrollar la MDCMD o que se ha expuesto a condiciones que pueden dar como resultado una MDCMD. Un sujeto "que se sospecha que tiene una MDCMD" es uno que tiene uno o más síntomas de una MDCMD. A partir de lo anterior será claro que ni los sujetos "en riesgo de desarrollar una MDCMD" ni los sujetos "que se sospecha que tienen una MDCMD" son todos los individuos dentro de una especie de interés.

En cualquiera de los métodos anteriores, la MDCMC puede ser una causada por el sustrato y el reactivo de Fc sirve para prevenir o mejorar la MDCMC.

Aplicaciones en ensayos inmunológicos

Los biomiméticos inmunológicamente activos divulgados en el presente documento pueden usarse para llevar a cabo ensayos inmunológicos para probar las funciones de células inmunitarias para cuya modulación se diseñaron los biomiméticos inmunológicamente activos.

La señalización a través de rutas de receptor Fc γ de baja afinidad requiere de la agregación y reticulación del receptor en la superficie celular. Se supone que estos parámetros de agregación y reticulación se cumplen mediante la unión de Fab a una diana específica del antígeno con la consiguiente interacción entre la región Fc y los Fc γ R de baja afinidad en la superficie de las células respondedoras. En este contexto, los anticuerpos tienen el potencial de evocar respuestas celulares a través de dos rutas diferentes: 1. Interacción/bloqueo de Fab con/de una diana específica de epítipo y 2. Interacciones de Fc con FcR. A pesar de este conocimiento, los controles actuales para la mayoría de los estudios terapéuticos que usan anticuerpos monoclonales empleados *in vivo* no abordan de manera adecuada el potencial de las interacciones Fc: receptor Fc γ como contribuyentes a los efectos funcionales observados. Actualmente se emplean múltiples estrategias para eliminar interacciones Fc:FcR como variables de confusión. Por ejemplo, algunos estudios emplean Scv (regiones variables de cadena individual) o fragmentos Fab, que retienen la especificidad de epítipo pero que carecen de la región Fc. Estas estrategias están limitadas por la corta semivida de estos reactivos y por su potencial limitado para inducir señalización. Otros estudios emplean proteínas de fusión compuestas de un receptor o ligando fusionado a un fragmento Fc. Aunque estos tipos de estrategias ayudan a diferenciar los efectos específicos de Fab de aquellos observados con interacciones de receptor-ligando, no controlan de manera eficaz los efectos mediados por Fc. Las evaluaciones de agentes terapéuticos basados en anticuerpos en modelos animales también pueden emplear anticuerpos de control de isotipo con un sitio de unión de Fab irrelevante. El razonamiento para esta elección está basado en la supuesta similitud funcional entre anticuerpos del mismo isotipo independientemente de su especificidad o afinidad de unión de Fab. Sin embargo, este uso de controles de isotipo irrelevantes tiene varios inconvenientes fundamentales:

1. Si los fragmentos Fab de estos anticuerpos no pueden unirse a un ligando o a un epítipo antigénico, es probable que los fragmentos Fc no estimulen la señalización a través del FcR de baja afinidad debido a la ausencia de reticulación del receptor Fc γ . Por lo tanto, las diferencias funcionales observadas entre anticuerpos experimentales y de control no pueden atribuirse correctamente a la interacción de Fab con una diana específica de epítipo que carece de medios para reticular con el Fc γ R.

2. Si se producen estos isotipos en células que producen diferentes glucoformas o diferentes porcentajes relativos de glucoformas individuales que el anticuerpo progenitor, se alterará la unión a FcR tanto de alta como de baja afinidad, incluso si la afinidad de Fab es idéntica.

Aunque no hay un control perfecto para superar este problema, una opción es el uso de moléculas biomiméticas de isotipo específico producidas en las mismas células que los anticuerpos progenitores y administrarlos a una dosis proporcional a los niveles de expresión del epítipo usado como diana por el anticuerpo experimental. Por ejemplo, el control adecuado para un anticuerpo específico de epítipo producido en ratas podría ser una molécula biomimética específica de isotipo de rata capaz de agregar receptor Fc γ sobre la superficie de células efectoras.

En general, se expone una célula inmunitaria a una cantidad eficaz de un biomimético inmunológicamente activo para modular una actividad de una célula inmunitaria de un modo conocido y esta modulación inmunitaria se compara con un compuesto o molécula de ensayo para determinar si el compuesto de ensayo tiene una actividad moduladora inmunitaria similar.

En otro enfoque, las moléculas biomiméticas agregadas por calor, y las inmunoglobulinas agregadas pueden usarse como reactivos para controles de laboratorio en diversos ensayos inmunológicos descritos en el presente documento y conocidos por los expertos en la materia.

Los ensayos inmunológicos pueden ser ensayos *in vitro* o ensayos *in vivo* y pueden implicar a células inmunitarias humanas o no humanas usando un estradómero de especie emparejada o de especie no emparejada. En un enfoque, se lleva a cabo un ensayo inmunológico usando una cantidad eficaz del biomimético inmunológicamente activo para modular una actividad de una célula inmunitaria y comparando la modulación con una modulación de una célula inmunitaria por un compuesto de ensayo. La molécula biomimética puede cumplir la función de un reactivo de control positivo en ensayos que implican la prueba de otros compuestos respecto de su efecto inmunológico. El ensayo puede comparar el efecto del anticuerpo monoclonal objeto en comparación con la molécula biomimética respecto de la unión a Fcγ y la respuesta funcional medida mediante cambios en el nivel de expresión de receptor, liberación de citocinas, y función, tal como mediante el uso de una reacción mixta de linfocitos. De esta manera, si una molécula biomimética (que carece del Fab) genera una respuesta que en parte similar a la del anticuerpo monoclonal, entonces el efecto del anticuerpo monoclonal, hasta cierto punto, no se debe a la especificidad de su Fab sino al efecto general de unión y reticulación de más de un receptor Fcγ sobre la célula efectora.

Si la actividad biológica de un anticuerpo específico de especie y específico de isotipo se replica en su totalidad o en parte por una molécula biomimética específica de especie y específica de isotipo entonces es evidente que la actividad Fc-receptor Fcγ representa la proporción de la actividad biológica observada atribuible a la molécula específica de especie y específico de isotipo. Por lo tanto, las moléculas biomiméticas específicas de especie y específicas de isotipo son útiles para evaluar anticuerpos terapéuticos potenciales para determinar si y hasta qué grado la actividad biológica observada puede atribuirse a la porción Fab del anticuerpo de ensayo o a un efecto no específico de la porción Fc de la molécula que se une a y reticula a más de un receptor Fcγ.

las moléculas biomiméticas de la presente invención también son útiles en el bloqueo de unión no específica de receptores Fc durante inmunoensayos a base de anticuerpos tales como citometría de flujo, transferencia de Western, inmunohistoquímica y ensayo de inmunofluorescencia. Tradicionalmente, en ensayos tales como estos, los anticuerpos no específicos de la misma especie como el anticuerpo de ensayo se usan para bloquear la unión no específica a receptores Fc. Las moléculas biomiméticas de la presente invención proporcionan un beneficio sobre medios tradicionales de bloqueo de Fc en que cada molécula tiene múltiples sitios de unión FcR y, por lo tanto, se pueden usar muchas menos moléculas. Adicionalmente, puesto que la molécula de la presente invención carece de la porción de unión a antígeno Fab del anticuerpo, la unión no específica a células muertas, por ejemplo, se observará como es habitual en el caso con IgG emparejada a especie de control. Las moléculas biomiméticas de la presente divulgación se ha encontrado sorprendentemente que unen endotoxina con muy alta afinidad. Los kits y columnas de retirada de endotoxinas estándar no retiran porcentajes significantes de la endotoxina fuertemente unida que proviene de estradómeros. Por lo tanto, las composiciones pueden ser útiles cuando actúan como una agrupación de unión para endotoxina una herramienta útil para la retirada de endotoxinas en preparaciones tanto farmacéuticas como de laboratorio. Esto resulta beneficioso en que los complejos formados entre la endotoxina y las moléculas biomiméticas tienen una suficientemente alta afinidad para retirar eficazmente endotoxina de una preparación o composición farmacéutica. En un enfoque, los complejos se retiran de la composición mediante filtración.

Ejemplos

La invención se define en las reivindicaciones y se refiere al polipéptido de SEQ ID NO:4. Se describen otras moléculas en sujeto a los siguientes experimentos para su referencia y su comparación.

Ejemplo 1 Producción y purificación

Se usaron células HEK293F (Invitrogen, Carlsbad, CA) o células de ovario de hámster chino (CHO) para la expresión estable de G045/M045 y G051. Las células HEK293F o CHO se cultivaron en suspensión para escalar la expresión proteica.

Los genes que codifican G045c (SEQ ID NO:4), G045old (SEQ ID NO:7) G051 (SEQ ID NO:18), G019 (SEQ ID NO:8), G028 (SEQ ID NO:9), G046 (SEQ ID NO:10), G075 (SEQ ID NO: 20), G076 (SEQ ID NO:21), G096 (SEQ ID NO:28), G098 (SEQ ID NO:24), G089 (SEQ ID NO:27) o las secuencias murinas correspondientes de las anteriores polipéptidos se clonaron en un vector que contenía un gen de resistencia a neomicina tal como pcDNA3.3 de Invitrogen (Carlsbad, CA) y con el control transcripcional del promotor de CMV para facilitar el alto nivel de expresión de G045 o G051. Se aisló ADN de plásmido para transfección a partir de cultivo bacteriano usando un kit de aislamiento de ADN de plásmido libre de endotoxinas (Nucleobond, Macherey-Nagel). G045c/ G045antigua y G051 que codifican ADN de plásmido se linealizó con enzima de restricción y se transfeció en células 293-F o células CHO. Después de la transfección de células positivas que expresan G045c, G045antigua o G051 se seleccionaron con Geneticina/G418 para obtener una agrupación de células transfectadas. Para obtener una línea celular clonal de células establemente transfectadas se diluyó a 1-2 células por pocillo en una placa de 96 pocillos a partir de la cual se obtuvieron clones de células únicas de la línea celular estable. Clones de célula única se cribaron mediante ELISA para su expresión proteica. Se cultivan clones de células únicas y G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098 o G089, proteína se cultiva a partir de medio como proteína secretada.

Para la producción de proteína G045c, G045antigua, G051 G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098, o G089

mediante transfección transitoria de células HEK293 o células CHO se transfectaron con ADN que codificaba las proteínas G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098, o G089 bajo control de un promotor de CMV para asegurar el alto nivel de expresión de la proteína. La transfección se realizó con uno de los varios reactivos de transfección disponibles en el mercado. G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, secretada se recoge a partir del medio de cultivo celular 4-5 días después de su transfección.

Se filtró medio de cultivo celular de líneas celulares o bien transfectadas transitoriamente o estables usando un filtro de 0,22 μ m y se ajustó a pH 7,2 con 1 volumen de tampón de unión (20 mM de fosfato de sodio pH 7,2 + 150 mM de NaCl) y se purificó mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de afinidad de proteína A HiTrap Mabselect usando sistema de purificación de AKTAXpress. (GE life sciences) Después de la elución de 0,1 M de citrato de sodio pH 3,3 se purificó proteína sobre una columna de desalación 26/20 HiPrep para el intercambio de tampón.

Para la purificación adicional de proteína G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098, o G089 se purifica mediante filtración por gen sobre una columna de filtración de gel HiLoad Superdex 200 (GE Lifesciences) en 50 mM de Tris-HCL pH7,5 + 150 mM NaCl seguido por purificación sobre columna de intercambio iónico de Mono S (GE Lifesciences). La purificación de intercambio iónico se realiza en 20 mM de tampón MES pH 6 con un gradiente 0-1 M de NaCl. Después de la cromatografía la proteína se ajusta a PBS mediante diálisis. Un esquema de la g045c resultante se ilustra en la Figura 1.

Para evaluar la capacidad de multimerización de la proteína G045c resultante, se llevó a cabo un gel de poliacrilamida al 10 % que contenía concentraciones iguales de G045c producidas por el método anterior y G045antigua, producida por el método previamente descrito en el documento WO 2008/151088 que contiene las secuencias de clonación extrañas. Sorprendentemente, la retirada de los fragmentos extraños llevó a un aumento notable en multimerización en G045c en comparación con G045antigua con G045c mostrando una concentración mucho mayor de multímeros ordenados superiores en comparación con G045antigua. (Véase la figura 2A).

La formación de multímeros en G045antigua frente a G045c se analizó usando un sistema de formación de imágenes de Gel-DocIT. Después del examen de densidad de las imágenes de gel se evaluó la cantidad de proteína en cada banda de gel. Sorprendentemente, la formación de multímeros en la muestra de G045antigua se estimó que era aproximadamente del 27,9 % mientras que la retirada de los fragmentos extraños para generar moléculas naturalmente unidas llevó a la formación de multímeros en la muestra G045c que fue significativamente superior y se estimó que era aproximadamente del 73,8 % de la proteína total. (Véase la Figura 2B).

Ejemplo 2: Eficacia potenciada de M045c en comparación con M045antigua en un modelo de ratón de artritis

Se llevó a cabo la evaluación de la eficacia de M045c en comparación con la de M045antigua en artritis inducida por colágeno. En el día 0 y día 21 se inmunizaron ratones DBA1/J con colágeno bovino tipo II (Chondrex, Inc., Cat. 20021) con una solución de 4 mg/ml emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Cat #5506). Los ratones se pesaron semanalmente y se puntuaron según los síntomas de la artritis. Cada pata se puntuó y la suma de todas las puntuaciones se registró como el Índice Artrítico (AI). El AI máximo posible fue de 16 del siguiente modo: 0 = sin efectos visibles de artritis 1 = edema y/o eritema de un dígito 2 = edema y/o eritema de 2 articulaciones 3 = edema y/o eritema de más de 2 articulaciones 4 = artritis grave de la pata entera y dígitos incluida deformación de la extremidad y anquilosis de la articulación. Iniciándose en el día 22 (día de tratamiento 0) se seleccionaron diez de los ratones inmunizados con colágeno en grupos de tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se designaron diez ratones no enfermos como el grupo no enfermo. Se midió el índice de artritis durante 14 días de tratamiento después de los cuales se sometió a eutanasia a los ratones. Para el grupo de control positivo diez de los ratones se escogieron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron oralmente con 10 ml/kg de prednisolona cada día. Para el grupo tratado con M045c o M045antigua 20 de los ratones se seleccionaron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron cada 4º día (día 0, día 4, día 8 y día 12) con 400 μ g M045c o M045old (17,4 mg/kg).

Los ratones tratados con M045c tenían estadísticamente menos enfermedad grave en comparación con la de los ratones tratados con M045antigua en casi todos los puntos de tiempo sometidos a ensayo. (Véase la Figura 3). Por lo tanto, la retirada del fragmento de clonación de 16 aminoácidos entre la secuencia líder y Fc de IgG1 lleva a no solo una mayor formación de multímeros, sino también a una eficacia aumentada frente a enfermedades inflamatorias.

La evaluación de la eficacia de M045c, M019, M028, M046 y M051 en artritis inducida por colágeno se llevó a cabo de forma similar y se comparó con la eficacia de prednisolona. Se indujo CIA en ratones tal como se ha descrito anteriormente y los ratones se trataron empezando el día 22 después de la inducción de CIA con 400 μ g de M045, M019, M028, M046 o M051 por vía intravenosa dos veces a la semana o 10 mg/kg de prednisolona cada día y se puntuó durante dos semanas según su AI, tal como anteriormente. Los ratones que recibían cada una de las moléculas sometidas a ensayo tuvieron estadísticamente menos enfermedad grave que los controles tratados con PBS (véase la Figura 9).

Ejemplo 3: Efecto sinérgico de M045 y Prednisolona en un modelo de ratón de artritis

Se llevó a cabo la evaluación de la eficacia de M045c combinada con baja dosis de prednisolona en un modelo de artritis inducida con colágeno. En resumen, en el día 0 y día 21 se inmunizaron ratones DBA1/J con colágeno bovino tipo II (Chondrex, Inc., Cat. 20021) con una solución de 4 mg/ml emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Cat #5506). Los ratones se pesaron semanalmente y se puntuaron según los síntomas de la artritis. Cada pata se puntuó y la suma de todas las puntuaciones se registró como el Índice Artrítico (AI). El AI máximo posible fue de 16 del siguiente modo: 0 = sin efectos visibles de artritis 1 = edema y/o eritema de un dígito 2 = edema y/o eritema de 2 articulaciones 3 = edema y/o eritema de más de 2 articulaciones 4 = artritis grave de la pata entera y dígito incluida deformación de la extremidad y anquilosis de la articulación. Iniciándose en el día 22 (día de tratamiento 0) se seleccionaron diez de los ratones inmunizados con colágeno en grupos de tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se designaron diez ratones no enfermos como el grupo no enfermo. Se midió el índice de artritis durante 14 días de tratamiento después de los cuales se sometió a eutanasia a los ratones. Para el grupo de control posito diez de los ratones se escogieron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron oralmente con 10 ml/kg de prednisolona cada día. Para el grupo tratado con M045c o diez de los ratones se seleccionaron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron cada 4º día (día 0, día 4, día 8 y día 12) con 400 µg de M045c (17,4 mg/kg). Para medir la sinergia entre prednisolona y M045c se trató un grupo con baja dosis de prednisolona 2 mg/kg cada día, un grupo se trató con baja dosis de M045c 200 µg/dosis dosificando cada 4º día y un grupo se dosificó con baja dosis de prednisolona 2 mg/kg más baja dosis de M045c 200 µg/dosis dosificando cada 4º día.

Mientras que una alta dosis de prednisolona (10 mg/kg) fue eficaz como único agente en la mejora de artritis inducida por colágeno, una baja dosis de prednisolona (2 mg/kg) fue solo marginalmente eficaz. Adicionalmente, una baja dosis de M045c (200 µg/dosis o 9,1 mg/kg) también fue ineficaz en la reducción de la gravedad de la enfermedad en comparación con controles sin tratar. Sin embargo, sorprendentemente, los ratones tratados con una baja dosis de prednisolona combinados con una baja dosis de M045c mostraron una disminución sinérgica (más que aditivo) en gravedad de enfermedad cuando se compararon con los grupos de tratamiento de prednisolona y M045c solo. (Véase la Figura 4).

Ejemplo 4: Análisis de unión de IgG2A, M045, M046, M028, M019 y G051 a receptores de ratón.

Los receptores FcγRIIIA, FcγRIIB y SIGN-R1 se inmovilizaron en un chip de CM4 usando inmovilización de amina a 560, 500 y 1000UR, respectivamente para compensar el tamaño de la proteína. M045c (SEQ ID NO:11), M046 (SEQ ID NO:15), M019 (SEQ ID NO:13) y M028 (SEQ ID NO: 14) se diluyeron en serie de 500 nM a 1,9 nM en tampón de ejecución de HBSS-EP y se inyectó a 20 µl/min durante 180 s. Se consiguió la regeneración mediante una inyección de 10 s de 1 mM de MgCl a 100 µl/min, seguida por un breve lavado con tampón de ejecución. Se calcularon los KD usando software de evaluación T100.

Para FcγR3A y FcγR2b de ratón, los homodímeros Fc de IgG2a de ratón se unen con mejor afinidad y disociación más rápida en comparación con cada una de las moléculas sometidas a ensayo. Para SIGN-R1 de ratón, los homodímeros Fc de IgG2a de ratón no se unen de forma apreciable mientras que las moléculas selectivas se asocian a grados variantes y disocian lentamente. (Véase la Figura 5).

Se evaluaron las fracciones de M045c en este modelo. M045F se fracciona en gel, en primer lugar, usando un sistema de purificación de proteínas de AktaXpress y una columna de grado de prep. GE HiLoad 16/60 Superdex 200. La Fracción 1 (M045 F1) contiene el componente de peso molecular más alto de los multímeros de M045 después de la separación de multímeros según su tamaño. M045 F2 es el componente de multímero con menor peso molecular y M045 F3 es la fracción de homodímero. Para FcγRIIIa, FcγRIIb de ratón (véase la Figura 6a), y SIGN-R1 (véase la Figura 6b) la afinidad de unión es la más alta con una lenta tasa de disociación para M045 F1 en comparación con otras fracciones o con Fc de IgG2a de control.

Para evaluar la unión de G051, se realizó un ensayo de interferometría de biocapa sobre un Octet 96 Red Instrument (ForteBio, Menlo Park CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Data Acquisition User Guide 6.4 ForteBio). Para el análisis de unión de proteína de unión, FcγRII de ratón marcado con His (sistema R&D cat# 1460-CD) y FcγRIII sistema R&D cat# 1960) se cargaron por separado sobre Biosensores anti-penta-His (ForteBio cat # 18-5077) a 10 µg/ml en 1X tampón de análisis cinético (ForteBio cat #18-5032). Para análisis de unión de proteína humana, FcγRIIb humano marcado con His (sistema R&D cat# 1875-CD) y FcγRIIIa sistema R&D cat# 4325-Fc) se cargó por separado sobre Biosensores anti-penta-His (ForteBio cat # 18-5077) a 10 µg/ml en 1X tampón de análisis cinético (ForteBio cat #18-5032). A continuación se midió la asociación de proteína de la carga de la punta del sensor mediante transferencia de puntos a preparaciones de o bien la fracción monomérica (sobre un intervalo de concentraciones) o bien las fracciones multiméricas (sobre un intervalo de concentraciones) en 1X de tampón de análisis cinético y se midió la disociación mediante la transferencia de puntas de sensor a 1X de tampón cinético. El análisis fue tal como se ha descrito (Data Analysis User Guide 6.4 ForteBio). El análisis se estandarizó como se ha descrito anteriormente asignando un MW de 50 kD a homodímeros y 150 kD a todas las otras preparaciones de proteínas.

La Tabla 2 muestra que las fracciones de multímeros más grandes de M051 se unen con mayor afinidad y avidez y disociación más lenta que fracciones de multímeros más pequeños que, a su vez, se unen con mayor afinidad y avidez y disociación más lenta que la fracción de homodímeros.

5

Tabla 2

Muestra	KD	Kon	Kdis	Rmax	R2	Fracción
M051	6,55E,-9	8,53E,+5	5,59E,-3	0,394	0,987	
Monómero M051	9,59E,-7	7,24E,+5	6,94E,-1	0,373	0,985	2A11
Dímero M051	1,25E,-8	1,45E,+6	1,81E,-2	0,4129	0,987	2H10
Trímero M051	3,36E,-9	1,28E,+6	4,28E,-3	0,5093	0,996	3E12
Tetramero M051	1,39E,-9	1,56E,+6	2,04E,-3	0,567	0,996	3H4
Multímero M051	1,77E,-9	4,19E,+6	1,15E,-4	0,6237	0,998	4F4

Para evaluar la cinética de unión de G045 o G051 con respecto a G001 (Fc de IgG1 nativa), se llevó a cabo un ensayo de interferometría de biocapa sobre un Octet 96 Red Instrument, tal como anteriormente. Se midió la unión de G045 y G001 a FcγRIIb humano FcγRIIIa (tanto las variantes F como V), FcγRIIIa cinomólogo, FcγRIIIb cinomólogo y FcγRIII cinomólogo. G045 tiene una afinidad de unión significativamente superior con disociación más lenta y muestra de avidez a cada uno de los receptores sometidos a ensayo en comparación con G001. (véase las Tablas 3 y 4).

10

Tabla 3

Receptor	Proteína	KD	kon	kdis	R max	R2
FcγRIIb humano	G045	1,42E,-9	7,99E,+5	1,14E,-3	0,7166	0,999
FcγRIIIa humano (F)	G045	1,22E,-9	6,20E,+5	7,567E,-4	0,7507	0,999
FcγRIIIa humano (V)	G045	2,95E,-10	6,07E,+5	1,79E,-4	0,9182	0,999
FcγRIIb cinomólogo	G045	1,19E,-9	7,56E,+5	8,81E,-4	0,7125	0,999
FcγRIIIa cinomólogo	G045	2,58E,-10	6,17E,+5	1,59E,-4	1,0356	0,999
FcγRIIb de ratón	G045	5,42E,-10	1,21E,+6	6,56E,-4	0,4555	0,998
FcγRIII de ratón	G045	8,00E,-10	1,03E,+6	8,23E,-4	0,519	0,998

15

Tabla 4

Receptor	Proteína	KD	kon	kdis	R max	R2
FcγRIIb humano	G001	1,31E,-6	6,86E,+5	8,99E,-1	0,19	0,986
FcγRIIIa humano (F)	G001	2,43E,-6	1,11E,+5	2,69E,-1	0,383	0,990
FcγRIIIa humano (V)	G001	1,14E,-6	1,18E,+5	1,35E,-1	0,7265	0,995
FcγRIIb cinomólogo	G001	2,04E,-6	3,94E,+5	8,06E,-1	0,3456	0,988
FcγRIIIa cinomólogo	G001	9,15E,-7	1,24E,-5	1,14E,-1	0,837	0,995
FcγRII de ratón*	G001	1,51E,-6	2,56E,+5	3,87E,-1	0,1173	0,963 *
FcγRIII de ratón *	G001	4,18E,-6	1,18E,+5	4,91E,-1	0,1026	0,904 *

De manera similar, se midió la unión de G051 y G001 a FcγRIIb humano y FcγRIIIa. G051 tiene una afinidad de unión significativamente superior con disociación más lenta y muestra de avidez a cada uno de los receptores sometidos a ensayo en comparación con G001. (Véase la Tabla 5).

20

Tabla 5

Proteína	Receptor	KD	Kon	Kdis	Rmax	R2
G001	FcγRIIb	2,99E,-06	3,72E,+05	1,11E,+00	0,3152	0,986
G001	FcγRIIIa	6,77E,-07	1,64E,+05	1,11E,-01	0,6535	0,991
G051	FcγRIIb	4,39E,-08	7,10E,+05	3,12E,-02	0,2868	0,991
G051	FcγRIIIa	2,30E,-08	2,83E,+05	6,50E,-03	0,886	0,996

Ejemplo 5: Los compuestos naturalmente unidos son eficaces en el tratamiento/prevenición de ITP

25

Para elucidar el efecto de moléculas biomiméticas en púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) se sometieron a ensayo moléculas biomiméticas en un modelo de ratón preventivo de ITP. Se indujeron bajos recuentos plaquetarios seguido de la exposición a anticuerpo anti-IIb de integrina de ratón que recubre receptores de integrina sobre plaquetas. En resumen, ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad (Charles River) se inyectaron en la vena caudal

con molécula o control el día 1 seguido de extracción de sangre y recuento plaquetario. En el día 2 después de la extracción de sangre y recuentos plaquetarios los ratones se trataron con MWReg30 (BD Pharmingen cat #553847) proporcionado a una concentración de 2 µg de anticuerpo en 200 µl de tampón fosfato salino mediante inyección intraperitoneal para inducir pérdida plaquetaria. La extracción de sangre para los recuentos plaquetarios e inyecciones MWReg30 continúan los días 3, 4 y 5. El control positivo de IVIG se dosifica diariamente en los días 2 a 5 y se tomaron los recuentos plaquetarios con el hemocitómetro Drew Scientific Hemavet 950. M045c y sus trañones se dosifican una vez el día 2. Se recoge sangre mediante hendidura de la vena caudal y mezclándose con tampón de citrato para evitar la coagulación.

M045c es significativamente protector en este modelo con respecto a no tratamiento de fármaco de ITP de control y Fc de IgG2a de control y es comparable tanto a terapia preventiva de IVIG y ratones que no recibieron la agresión de MWReg30 (véase, la Figura 7). Se realizaron fracciones de M045c como se describe en el Ejemplo 4. La fracción M045 de Fracción 1 es significativamente protectora en este modelo con respecto a control de ITP sin tratamiento de fármacos mientras que M045 Fracción 3 no lo es.

Ejemplo 6: Retiración de complejos de endotoxinas con complejos naturalmente unidos

Para retirar endotoxina, se ajustará una solución de proteína que contiene endotoxinas que contiene una proteína de interés a pH 7,2 con 1 volumen de tampón de unión (20 mM de fosfato de sodio pH 7,2 +150 mM de NaCl) después de mezclar molécula biomimética de unión de endotoxinas a la solución. Para retirar la endotoxina, la solución que contiene la proteína se aplicará a una columna de cromatografía de afinidad (columna de afinidad de proteína A HiTrap Mabselect, GE Life Sciences). La endotoxina unida a molécula biomimética se unirá a la columna de afinidad y la proteína libre de endotoxinas purificadas se eluirá en el flujo a través de fracciones.

En un enfoque alternativo al uso de moléculas biomiméticas para atrapar endotoxina, perlas magnéticas recubiertas con proteína A (New England BioLabs, MA) se mezclarán en la solución de proteínas que contiene endotoxinas junto con moléculas de unión de endotoxinas y la endotoxina unida se retirará mediante separación magnética.

Ejemplo 7: Uso de complejos naturalmente unidos para bloqueo de Fc en ensayos inmunológicos

Mejora de la sensibilidad y especificidad de herramientas de investigación a base de anticuerpos y diagnóstico clínico. La utilidad de investigación y utilidad de diagnóstico clínico de anticuerpos queda limitada por unión no específica. Esto se puede producir, por ejemplo, mediante la unión de la porción Fc de anticuerpos monoclonales o policlonales a receptores Fc gamma de alta afinidad y otros receptores de unión de Fc sobre células que incluyen células inmunitarias y tumores o mediante la unión de agregados de anticuerpos o agregados celulares recubiertos con anticuerpo a receptores Fc gamma de baja afinidad.

Para demostrar la capacidad de las moléculas de la invención de bloquear las interacciones de receptores Fc gamma con anticuerpos anti-Fc gamma específicos realizamos una citometría de flujo y se comparó dosis en aumento de estradómero humano de G045c con G001, un monómero homodimérico Fc de IgG1, en su capacidad de bloquear anticuerpo anti-FcγR que se une a FcγRs conocidos por estar presentes en células específicas. Se encontró que G045c bloqueaba eficazmente la unión de anticuerpos anti-FcγR que se unen a FcγR con respecto a Fc de IgG1 de control y para hacer lo mismo de un modo dependiente de la concentración (véase la Figura 8).

Debido a su muy alta afinidad de unión de receptores Fc gamma y otros receptores que unen regiones Gc de inmunoglobulina, las moléculas de la invención son eficazmente en el bloqueo de la unión e interacción incluso de anticuerpos monoclonales de receptores anti-Fc gamma específicos. Las moléculas de la invención son, por lo tanto, útiles como reactivos de control para disminuir la unión de anticuerpos no específica de anticuerpos administrados tanto en el entorno de las herramientas de investigación como el entorno de diagnóstico clínico.

Ejemplo 8: Los compuestos naturalmente unidos son eficaces en el tratamiento de neuritis autoinmunitaria experimental

La evaluación de la eficacia de M045c y M051, en cada caso comparada con la de IVIG y a albúmina, se realizó en un modelo de rata de neuritis autoinmunitaria experimental (EAN). Los modelos de EAN murinos son modelos animales ampliamente usados de poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria. En resumen, 45 ratas Lewis se inmunizaron con mielina de nervio periférico bovina completa y se distribuyó al azar en tres grupos. Al inicio de las deficiencias clínicas, que es, en general, pérdida de peso empezando el día 9 o 10, 15 ratas por grupo de tratamiento se trataron con (1 gm / 1 Kg de peso corporal), M045 (20 mg/Kg) o M051 (17,5 mg/Kg) o con albúmina todas proporcionados como dos dosis IV en dos días consecutivos. Todos los fármacos se administraron por vía intravenosa mediante inyección en la vena caudal.

Se evaluaron ratas EAN clínicamente, electrofisiológicamente e histológicamente. La gravedad de la enfermedad clínica se evaluó mediante graduación clínica diaria y mediante cambios de peso. Los estudios electrofisiológicos incluían el examen de la amplitud de los potenciales de acción muscular del compuesto (CMAP) y velocidad de conducción motora (MCV). En el día 15 en el máximo de la enfermedad, se sacrificaron cinco ratas de cada grupo,

se recogieron los nervios ciáticos y se analizaron los cambios histopatológicos. La eficacia de tratamiento se comparó entre los grupos IVIg y albúmina y M045c recombinante o grupos M051 y albúmina.

Las ratas que recibían la M045c sometida a ensayo tuvieron estadísticamente menos enfermedad grave que los controles tratados con albúmina (véase la Figura 12). Ratas EAN tratadas con albúmina presentaron una mortalidad superior (4 de 15) en comparación con tratadas con IVIg (1 de 15) y con ratas tratadas con M045c (0 de 15). Los animales que recibieron tratamiento con M045c y IVIg mostraron significativamente menos pérdida notable de peso. Hubo una mejora estadísticamente significativa en tanto velocidad de conducción motora (MCV) como las amplitudes de CMAP distales y proximales en ratas tratadas con IVIg y M045c en comparación con aquellas tratadas con albúmina. Las ratas tratadas con albúmina mostraron más pérdida axonal grave y degeneración axonal activa en nervios ciáticos en comparación con ratas tratadas con IVIg y M045c. Por lo tanto, M045c demostró mortalidad, eficacia de peso, clínica, electrofisiológica e histopatológica en comparación con albúmina, comparable con la eficacia demostrada por la IVIg estándar de oro clínica a aproximadamente el 2 % de la dosis de IVIg.

En un experimento por separado con 11 ratas por grupo de ensayo, las ratas que recibían la M051 sometida a ensayo tuvieron estadísticamente menos enfermedad grave que los controles tratados con albúmina (véase la Figura 11). En este estudio, 7 de 11 animales murió en el grupo de control (albúmina) en comparación con 4 en el grupo de M051. Las ratas que recibían o bien IVIg o bien M051 demostraron significativamente menos pérdida de peso en comparación con ratas que recibían control de albúmina. Las ratas que recibían o bien IVIg o M051 demostraron una mejora significativa en puntuaciones clínicas en comparación con ratas que recibían control de albúmina. Hubo una mejora estadísticamente significativa en tanto MCV como en la amplitud de CMAP después del tratamiento con IVIg o M051. Por lo tanto, M051 demostró mortalidad significativa, eficacia de peso, clínica y electrofisiológica en comparación con albúmina, comparable con la eficacia demostrada por la IVIg estándar de oro clínica a aproximadamente el 2 % de la dosis de IVIg.

Ejemplo 9: Compuestos naturalmente unidos que contienen mutaciones Fc muestran unión aumentada a FcγR y son eficaces para el tratamiento en un modelo de ratón de artritis

La unión del G075 (SEQ ID NO:20) y G076 (SEQ ID NO:21) que contiene mutante Fc a FcγRIIIa, FcγRIIb y FcγRIIa se llevó a cabo mediante ensayo de unión de Biacore como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. G075 mostró un aumento de unión a FcγRIIIa y una reducción de unión a FcγRIIa y FcγRIIb mientras que G076 mostró una disminución de unión a FcγRIIIa y un aumento de unión a FcγRIIa y FcγRIIb. (Véanse las Figuras 10A y B).

La evaluación de la eficacia de M075 (SEQ ID NO:22), M076 (SEQ ID NO:23) y M098 (SEQ ID NO:25) que contenía mutante Fc sobre un modelo de ratón de artritis se determinó a continuación como se ha hecho en el Ejemplo 3 anterior. Las moléculas que contenían mutante Fc se compararon con el vehículo y M045c. Tanto M098 y M075 fueron significativamente más eficaces en la inhibición de la progresión de CIA, mientras que M076 no. (Véanse las Figuras 13 A y B). Esperamos que otras mutaciones de Fc de inmunoglobulina que se conocen por alterar la unión Fc-FcR individual o que alteran la citotoxicidad dependiente del complemento será similarmente complementaria con las moléculas que comprenden Fc de IgG1 y que presente Fc de IgG1 con respecto a receptores Fc.

Métodos que emplean Fc fijos

Para entender el papel de las interacciones de Fc: receptor Fc gamma (FcγR, el receptor Fc para Fc de IgG) y la importancia para la función de hIVIG de que su Fc esté inmovilizado biológicamente en una inmunoglobulina, se compararon los efectos de hIVIG tanto con una forma fija de un fragmento Fc de IgG1 recombinante (rFCF) y una forma soluble de un fragmento Fc de IgG1 recombinante (sFc) que contiene los dominios bisagra-CH2-CH3 en la función de monocitos durante el proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDC).

La exposición de monocitos cultivados con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina-4 (IL-4), a rFCF inmovilizado y a hIVIG inmovilizado, pero no a bajas dosis de hIVIG soluble, potenció la expresión de CD86, retrasó la expresión de CD11c, y suprimió la expresión de CD11a en las células. Además, es probable que estos cambios no sean secundarios a la inmovilización no específica de proteína del rFCF sobre plástico, ya que hIVIG soluble agregada por calor (sHA), sHA rFCF o hIVIG a alta dosis (que se reconoce que contiene Fc multiméricos), indujeron cambios similares a aquellos observados con rFCF inmovilizado.

Tomados en conjunto, nuestros datos indican que la exposición de iDC a hIVIG inmovilizado sobre la superficie de un sustrato sólido, semisólido, o gelatinoso da como resultado una población única de DC (alto CD86, bajo CD11a), capaz de orquestar tolerancia inmunitaria, y que las moléculas inmovilizadas que incluyen la porción funcional de fragmentos Fc de inmunoglobulina G (IgG) pueden ser útiles como miméticos de hIVIG para el tratamiento de inflamación local y sistémica, así como una gran variedad de otras afecciones patológicas que están, directa o indirectamente, mediadas por células derivadas de monocitos (MDC), tales como iDC. Además, la inmovilización de la porción funcional de Fc de IgG sobre dispositivos, descritos en el presente documento como "dispositivos de recubrimiento", que se implantan en los organismos o se acoplan a los cuerpos de animales (por ejemplo, pacientes humanos) con moléculas que contienen la porción funcional del fragmento Fc de IgG puede aminorar, si no prevenir, las respuestas inflamatorias a tales dispositivos o tratar enfermedades sistémicas afectando células inmunitarias que

a continuación, pasan a la circulación, que han sido alteradas por el contacto con el estradómero fijo recubierto sobre o en el dispositivo implantado.

La invención proporciona un método para inhibir la actividad de una célula procedente de monocitos (MDC). El método incluye poner en contacto la célula con una composición que comprende un sustrato con un reactivo de Fc unido al mismo. La puesta en contacto puede ser *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Como alternativa, la célula puede encontrarse en un animal. El animal puede ser uno que tenga, o esté en riesgo de desarrollar, una afección mediada por células derivadas de monocitos (MDCMC). La MDC puede ser, por ejemplo, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, o un osteoclasto.

La invención también proporciona un método de tratamiento o profilaxis. El método incluye administrar a un animal una composición que contiene un sustrato que tiene un reactivo de Fc unido a éste, siendo el animal uno que tenga o esté en riesgo de desarrollar una MDCMC.

También es posible que los estradómeros de la presente invención lleven a un reactivo Fc fijado *in vivo*. Por "reactivo Fc fijado *in vivo*" nos referimos a Fc fijado a la superficie de células, por ejemplo, plaquetas, *in vivo*. Se ha observado que las plaquetas que expresan FcγR están eficazmente recubiertas con los estradómeros de la presente invención y que estas plaquetas inducen tolerancia en un organismo hasta que se limpian. Los estradómeros de la presente invención se ha observado sorprendentemente que se unen eficazmente al porcentaje de plaquetas que expresan FcγR. Como ova: complejos agregados de anti-ova y complejos de agregados RBC:anti-RBC inducen tolerancia y previenen la destrucción de plaquetas en ITP, estas plaquetas recubiertas de estradómeros pueden inducir tolerancia en un organismo. Esto puede ser otro mecanismo mediante el cual los estradómeros de la presente invención ejercen sus funciones de modulación inmunitaria.

Basándose en la mucho mayor afinidad de unión a receptores Fc gamma del estradómero en comparación con el Fc de inmunoglobulina nativa contenido dentro del estradómero también es posible que los estradómeros de la presente invención lleven a un reactivo de control Fc de inmunoglobulina fijado *in vivo*. Por "reactivo de control Fc de inmunoglobulina fijado *in vivo*" nos referimos a estradómero fijado a la superficie de células, incluyendo, pero sin limitación a monocitos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos T reguladores, linfocitos T gamma delta y plaquetas, *in vivo*. Mediante la unión a receptores de superficie celular incluidos receptores Fc gamma, los estradómeros bloquean otras inmunoglobulinas de que se unan a estos receptores. Los anticuerpos monoclonales y policlonales se usan en ensayos de investigación tales como citometría de flujo y diagnósticos clínicos. Un aspecto importante de la presente invención es la prevención de unión no específica por el componente Fc de estos anticuerpos a receptores Fc gamma y otros receptores de superficie celular a la que se puede uner Fc de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "afección mediada por células derivadas de monocitos (MDCMC)" se refiere a una afección patológica que se debe directa o indirectamente, parcial o completamente, a la actividad de, o a factores producidos por, células derivadas de monocitos. Las células derivadas de monocitos incluyen, pero sin limitación, monocitos, macrófagos, células dendríticas interdigitantes (citadas generalmente en el presente documento como "células dendríticas" que comprenden células similares a las dendríticas y células similares a las dendríticas foliculares) (maduras e inmaduras), osteoclastos, células similares a la microglía, células similares a las de islote productoras de insulina derivadas de monocitos, mastocitos inmaduros derivados de monocitos y micropartículas derivadas de monocitos.

Con respecto a los métodos que usan Fc fijos, la expresión "reactivo de Fc" se refiere a cualquier molécula, o complejo molecular, que incluye una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, o más) porciones funcionales de un fragmento Fc de inmunoglobulina Ig (IgG). El fragmento Fc de IgG consiste en las porciones C-terminales de las dos cadenas pesadas de IgG de una molécula de IgG unidas y consiste en las regiones bisagra, los dominios CH2, y los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas unidas. La "porción funcional del fragmento Fc de IgG" consiste en las regiones bisagra, los dominios CH2, y opcionalmente, todos o algunos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, o 49) de los 50 primeros aminoácidos (desde el extremo N-terminal de los dominios CH3, de ambas cadenas pesadas unidas. En los seres humanos, (a) la región bisagra de IgG1 contiene 15 aminoácidos, el dominio CH2 contiene 110 aminoácidos, y el dominio CH3 contiene 106 aminoácidos; (b) la región bisagra de IgG2 contiene 12 aminoácidos, el dominio CH2 contiene 109 aminoácidos, y el dominio CH3 contiene 107 aminoácidos; (c) la región bisagra de IgG3 contiene 62 aminoácidos, el dominio CH2 contiene 104 aminoácidos, y el dominio CH3 contiene 106 aminoácidos; y (d) la región bisagra de IgG4 contiene 12 aminoácidos, el dominio CH2 contiene 109 aminoácidos, y el dominio CH3 contiene 107.

Al igual que en las moléculas de IgG de tipo silvestre, en los reactivos de Fc anteriormente descritos las dos cadenas polipeptídicas derivadas de cadenas pesadas de IgG son generalmente, pero no necesariamente, idénticas. Por lo tanto, un reactivo de Fc puede ser, sin limitación, una molécula de IgG completa, una molécula de IgG completa unida a un polipéptido no procedente de inmunoglobulina, un fragmento Fc de IgG, un fragmento Fc de IgG unido a un polipéptido no procedente de inmunoglobulina, una porción funcional de un fragmento Fc de IgG, una porción funcional de un fragmento Fc de IgG unida a un polipéptido o multímeros no derivadas de inmunoglobulina (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nomámeros, o

decámeros) de cualquiera de estos. Los reactivos de Fc también pueden ser los estradómeros y estradocuerpos anteriormente descritos que se encuentran dentro de la definición de un reactivo de Fc anterior.

En el Fc fijo, los componentes de cadena pesada de inmunoglobulina de los reactivos de Fc pueden tener secuencias de aminoácidos de tipo silvestre o pueden ser secuencias de aminoácidos de tipo silvestre con no más de 20 (por ejemplo, no más de: 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1) sustitución de aminoácidos. Dichas sustituciones son preferentemente, pero no necesariamente, sustituciones conservativas. Los cambios conservativos incluyen normalmente cambios dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina, y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

Un "reactivo de Fc" tiene al menos un 25 % (por ejemplo, al menos: 30 %; 40 %; 50 %; 60 %; 70 %; 80 %; 90 %; 95 %; 98 %; 99 %; 99,5 %; 100 % o incluso más) de la capacidad de la molécula de IgG de la que proceden los componentes de cadena pesada de IgG del reactivo de Fc (la molécula de IgG de referencia) para unirse a un receptor Fc de interés. En los casos donde un "reactivo de Fc" tiene componentes de cadena pesada procedentes de más de un tipo de molécula de IgG, la molécula de IgG de referencia es la que se une con la mayor avidez al receptor de Fc relevante de interés.

Tal como se usa en el presente documento, "Fc fijo" se refiere a un reactivo de Fc que está unido a un "sustrato" tal como se define más adelante. Las expresiones "Fc fijo", "Fc unido" y "Fc estabilizado" son expresiones sinónimas. El Fc fijo está compuesto de la porción funcional de Fc (incluyendo, pero sin limitación, cualquier polipéptido que incluye la porción funcional de Fc) unido a un sustrato. El Fc fijo incluye, por ejemplo, la unión directa así como la unión indirecta a través de polímeros de Fc al sustrato; la incorporación del Fc de IgG completo aislado; la incorporación únicamente de los dominios funcionales de Fc de IgG; o la incorporación del Fc de IgG completo o de dominios funcionales de Fc de IgG como parte de un polipéptido mayor, tal como un anticuerpo, un estradómero, o un estradocuerpo.

Como se aplica a Fc fijado, el término "sustrato" se refiere a un objeto sólido, semisólido o gelatinoso. El sustrato puede implantarse en, o unirse (o adherirse) a la superficie de, el cuerpo de un animal. El sustrato puede incluir, por ejemplo, componentes líquidos o gaseoso pero al menos una porción del sustrato es sólido, semisólido o gelatinoso. Por lo tanto, un sustrato puede ser una sustancia que es sustancialmente insoluble en disolvente acuoso pero soluble en un disolvente no acuoso. Tales sustancias incluyen lípidos (por ejemplo, fosfolípidos), ácidos grasos, y otros compuestos liposolubles, insolubles en disolventes acuosos. A partir de esto, será evidente que los sustratos incluyen liposomas. El sustrato puede ser poroso o no poroso. En determinadas realizaciones, el sustrato es inerte para la superficie y/o el organismo en el que se implanta, une, o adhiere.

El sustrato puede contener o estar hecho de un polímero sintético, por ejemplo, nailon, Teflón, dacron, cloruro de polivinilo, PEU (poli (éster uretano)), PTFE (politetrafluoroetileno), PMMA (metil metacrilato) PEEK, elastómeros termoplásticos, polímeros radiopacos, polietersulfona, silicios, policarbonatos, poliuretanos, poliisobutileno y sus copolímeros, poliésteres, poliolefinas, poliisobutileno, copolímeros de etileno-alfaolefina, polímeros y copolímeros acrílicos, polímeros de haluro de vinilo y copolímeros tales como cloruro de polivinilo, éteres de polivinilo, polivinilmetiléter, haluros de polivinilideno, fluoruro de polivinilideno, cloruro de polivinilideno, poliacrilonitrilo, polivinilcetonas, aromáticos de polivinilo, poliestireno, ésteres de polivinilo, poli(acetato de vinilo), copolímeros de monómeros de vinilo, copolímeros de monómeros de vinilo y olefinas, copolímeros de etileno-metacrilato de metilo, copolímeros de acrilonitrilo-estireno, resinas ABS, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, poliamidas, Nailon 66, policaprolactona, resinas alquídicas, polioxiéteres, poliimidas, poliéteres, resinas epoxi, rayón-triacetato, celulosa, acetato de celulosa, butirato de celulosa, butirato acetato de celulosa, celofán, nitrato de celulosa, propionato de celulosa, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa, colágenos, quitinas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico-óxido de polietileno, polisiloxanos, polisiloxanos sustituidos, copolímeros de etileno vinil acetato, elastómeros de poliolefina y cauchos de EPDM y combinaciones de los mismos.

El sustrato también puede contener o estar fabricado de un metal o una aleación de metal, por ejemplo, acero inoxidable, platino, iridio, titanio, tantalio, aleación de níquel-titanio y aleación de cobalto-cromo. Además, el sustrato también puede ser o incluir un tejido animal o producto de tejido animal, por ejemplo, un injerto de tejido u órgano. El tejido animal puede ser, por ejemplo, hueso (por ejemplo, hueso osteogénico) o cartílago. Además, el sustrato puede contener una proteína, por ejemplo, colágeno o queratina. El sustrato también puede ser o contener una matriz tisular, por ejemplo, una matriz tisular acelular. Las matrices acelulares en partículas o no en partículas se describen detalladamente en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.336.616 y 6.933.326, cuyas divulgaciones se han incorporado por referencia en su totalidad al presente documento. El sustrato también puede ser o incluir una célula animal (por ejemplo, células reparadoras de tejidos, tales como fibroblastos; células madre mesenquimales) y puede ser, por ejemplo, un trasplante de unidad folicular. El sustrato puede contener o ser un polisacárido, por ejemplo, agarosa. También puede contener o ser una sal, preferentemente una sal relativamente insoluble, por ejemplo, sulfato de calcio. El sustrato puede ser un gel o una crema. Además, puede contener silicona o silástico. Los sustratos también pueden contener una fibra natural, por ejemplo, seda, algodón, o lana.

Además, el sustrato puede ser un dispositivo médico implantable. Puede estar, por ejemplo, un stent (por ejemplo,

un stent vascular, tal como un stent de la arteria coronaria; un stent de las vías aéreas, tal como un stent endotraqueal o nasal; un stent gastrointestinal, tal como un stent biliar o pancreático; o un stent urinario, tal como un stent ureteral) o una sutura quirúrgica (por ejemplo, una seda trenzada, tripa cromada, nailon, plástico, o una estructura metálica) o un clip quirúrgico (por ejemplo, un clip de aneurisma). El sustrato puede ser, por ejemplo, una cadera artificial, una articulación artificial de la cadera, una rodilla artificial, una articulación artificial de rodilla, un hombro artificial, una articulación artificial de hombro, una articulación artificial de un dedo de la mano o del pie, una placa ósea, una clavija ósea, un implante óseo no de unión, un implante de disco intervertebral, cemento óseo, o un espaciador de cemento óseo. Puede ser también una derivación arteriovenosa, un alambre implantable, un marcapasos, un corazón artificial, un dispositivo de asistencia cardíaca, un implante coclear, un desfibrilador implantable, un estimulador de la médula espinal, un estimulador del sistema nervioso central, o un implante de sistema nervioso periférico. Otros sustratos son prótesis dentales o coronas dentales.

En otras realizaciones, el sustrato puede ser un dispositivo o jaula de filtrado de émbolos de grandes vasos, un dispositivo percutáneo, un parche dérmico o subdérmico, o un dispositivo de administración de fármaco implantable. El sustrato también puede ser un injerto de un gran vaso sanguíneo, en el que el vaso sanguíneo es, por ejemplo, una arteria carótida, una arteria femoral, o una aorta. Además, el sustrato puede ser un implante subdérmico, un implante de córnea, una lente intraocular o una lente de contacto.

El sustrato puede estar en forma de una lámina, una perla, una malla, una partícula de polvo, un filamento, una perla, o una fibra. También puede incluir o ser una sustancia sólida, semisólida o gelatinosa. El sustrato también puede ser una célula que expresa FcγR. Preferentemente, el sustrato es una plaqueta.

Polímeros útiles en la invención son preferentemente esos que son bioestables, biocompatibles, particularmente durante la inserción o implante del dispositivo en el organismo y evitar la irritación del tejido corporal.

Los reactivos Fc pueden recubrirse (es decir, fijarse o estabilizarse) sobre sustratos en cualquiera de varios modos. Por ejemplo, pueden recubrirse directamente sobre la superficie de sustratos donde permanecen unidos por, por ejemplo, interacciones hidrófobas. A continuación se describen algunas otras metodologías ((a) - (e)) que implican el uso de polímeros:

(a) El reactivo Fc se mezcla con una mezcla de polímero miscible que después se extiende a modo de lámina sobre la superficie del material sintético implantable, estabilizando de este modo el reactivo de Fc. Los monómeros usados rutinariamente en la técnica para producir mezclas de polímeros incluyen PLMA [poli(metacrilato de laurilo)]; PEG [polietilenglicol], PEO [óxido de polietileno]; los polímeros de metacrilato funcionalizados con alquilo PMMA, PEMA, PPMA, y PBMA; itaconatos; fumaratos; y estirénicos.

(b) Se adhiere una capa de revestimiento polimérico inferior o una película de dimensiones nanométricas a la superficie del sustrato y después se adhiere el reactivo de Fc a la capa de recubrimiento polimérico inferior o a la película de dimensiones nanométricas, estabilizando de este modo el reactivo de Fc.

(c) Se aplica una fina capa de un polímero a la superficie del sustrato implantable y después se hace polimerizar el monómero. Tales monómeros incluyen, por ejemplo, metano, tetrafluoroetileno, benceno, metanol, óxido de etileno, tetraglima, ácido acrílico, alilamina, metacrilato de hidroxietilo, N-vinil pirrolidona, y mercaptoetanol. Entonces se une el reactivo de Fc al monómero resultante.

(d) El sustrato se recubre con una proteína, tal como proteína A o albúmina que se une al reactivo de Fc, estabilizando de este modo el Fc a la superficie del sustrato.

(e) El reactivo Fc puede marcarse con una cadena de aminoácidos hidrófoba que se une a materiales sintéticos implantables y hace que el Fc estabilizado se oriente de manera uniforme.

Los métodos pueden aplicarse a cualquier especie animal y las moléculas de IgG a partir de las cuales se producen las porciones derivadas de IgG de reactivos de Fc pueden ser de cualquier especie animal. Naturalmente, las especies animales relevantes son aquellas en las que aparecen moléculas de IgG o similares a IgG. En general, la especie a la que se aplican los métodos y la especie de procedencia de las porciones procedentes de IgG de los reactivos de Fc usados en los métodos son la misma. Sin embargo, no son necesariamente iguales. Las especies animales relevantes son preferentemente mamíferos y estos incluyen, sin limitación, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuínos y chimpancés), caballos, animales bovinos (por ejemplo, toros, vacas, o bueyes), cerdos, cabras, oveja, perros, gatos, conejos, jerbos, hámsteres, ratas y ratones. Las especies no de mamífero incluyen, por ejemplo, pájaros, pollos, pavos, y patos) y peces.

Los términos "tratando", "tratamiento", y "profilaxis" tienen el mismo significado usando Fc fijo tal como se describe anteriormente para estradómeros.

Cuando los Fc fijados son dispositivos implantables recubiertos con reactivos Fc, pueden implantarse en, unirse a o adherirse a órganos o tejido interno relevante o superficies corporales de sujetos relevantes mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Cuando se formulan como, por ejemplo, suspensiones, polvos, pueden formularse y administrarse como se ha descrito anteriormente para los estradómeros.

Los reactivos Fc fijados de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir afecciones que incluyen pero

no limitadas a cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), vasculitis, rosácea, acné, eczema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de médula ósea; pérdida ósea; enfermedad de Paget, formación de hueso hipertrófico; osteopenia por desuso; desnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhans, lesión de la médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monoostótica, displasia fibrosa polioostótica, reconstrucción periodontal, y fracturas óseas, gestión del dolor óseo, e hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de trasplantes e infecciones víricas.

Todas las enfermedades autoinmunitarias pueden ser en parte o en su totalidad una MDCMD. El término "enfermedad autoinmunitaria" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo variado de más de 80 enfermedades crónicas. En todas estas enfermedades, el problema subyacente es que el sistema inmune del organismo ataque al organismo propio. Las enfermedades autoinmunitarias afectan a todos los sistemas orgánicos principales que incluyen tejido conectivo, nervios, músculos, sistema endocrino, piel, sangre y los sistemas respiratorias y gastrointestinales.

La enfermedad autoinmunitaria puede ser un proceso hematoinmunológico, incluyendo, pero sin limitación púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia aloinmunitaria/autoinmunitaria, trombocitopenia inmunitaria adquirida, neutropenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmune, aplasia de glóbulos rojos asociada al parvovirus B19, autoinmunidad anti-factor VIII adquirida, enfermedad de von Willebrand adquirida, mieloma múltiple o gammopatía monoclonal de significado desconocido, septicemia, anemia aplásica, aplasia pura de glóbulos rojos, anemia de Diamond-Blackfan, enfermedad hemolítica del neonato, neutropenia mediada por inmunidad, refractariedad a la transfusión de plaquetas, púrpura post-transfusión neonatal, síndrome urémico hemolítico, vasculitis sistémica, púrpura trombocitopénica trombótica, o síndrome de Evan.

La enfermedad autoinmunitaria puede ser un proceso neuroinmunológico, incluyendo, pero sin limitación, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante de IgM paraproteínémica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia grave, neuropatía motora multifocal, síndrome de la neurona motora inferior asociado con anti-/GMI, desmielinización, esclerosis múltiple y neuritis óptica, síndrome del hombre rígido, degeneración cerebelar paraneoplásica con anticuerpos anti-Yo, encefalomiелitis paraneoplásica, neuropatía sensorial con anticuerpos anti-Hu, epilepsia, encefalitis, mielitis, mielopatía asociada especialmente con virus-1 linfotrófico de linfocitos T humanos, neuropatía diabética autoinmunitaria o neuropatía disautonómica idiopática aguda.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico reumático, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Kawasaki, artritis reumatoide, síndrome de Felty, vasculitis positiva a ANCA, polimiositis espontánea, dermatomiositis, síndromes antifosfolípido, abortos espontáneos recurrentes, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, síndrome de Raynaud, síndrome de CREST, o uveítis.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico dermatoinmunológico, incluyendo, pero sin limitación, necrólisis epidérmica tóxica, gangrena, granuloma, enfermedades de la piel con ampollas autoinmunitarias, incluyendo pénfigo vulgar, penfigoide bulloso, y pénfigo foliáceo, vitiligo, síndrome de choque tóxico estreptocócico, esclerodermia, escleroderma, esclerosis sistémica, incluyendo esclerosis sistémica cutánea difusa y limitada, o dermatitis atópica (especialmente dependiente de esteroides).

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico inmunológico musculoesquelético, incluyendo, pero sin limitación, miositis por cuerpos de inclusión, fascitis necrotizante, miopatías inflamatorias, miositis, miopatía anti-decorin (antígeno BJ), miopatía necrótica paraneoplásica, miopatía vacuolada ligada a X, polimiositis inducida por penacilamina, aterosclerosis, cardiopatía isquémica, o cardiomiopatía.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser un proceso patológico inmunológico gastrointestinal, incluyendo, pero sin limitación, anemia perniciosa, hepatitis crónica activa autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca, dermatitis herpetiforme, cirrosis criptogénica, artritis reactiva, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, colitis ulcerosa, o colangitis esclerosante.

La enfermedad o afección autoinmunitaria puede ser enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo de injerto mediado por anticuerpos, rechazo después de trasplante de médula ósea, inflamación patológica post-infecciosa, linfoma, leucemia, neoplasia, asma, diabetes mellitus de tipo 1 con anticuerpos anti-células beta, síndrome de Sjögren, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Addison, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, micropoliarteritis, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa o fallo orgánico multisistémico.

"Cáncer" en el presente documento se refiere a o describe la afección fisiológica en mamíferos que está caracterizada normalmente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluido liposarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, fibrosarcoma,

mixosarcoma, condrosarcoma), osteoclastoma, tumores neuroendocrinos, mesotelioma, cordoma, sinovioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, tumor de Ewing, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, Macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad mielodisplásica, enfermedad de la cadena pesada, tumores neuroendocrinos, Schwannoma y otros carcinomas, cáncer de cabeza y cuello, neoplasias mieloides, tales como leucemias mielógenas, incluyendo AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos, y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo, tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma, y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer de páncreas, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer de testículo, cánceres uterinos, vaginales o cervicales, cáncer de ovarios, cáncer de hígado primario o cáncer de endometrio, tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), neoplasias hematológicas y afecciones similares a neoplasias, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no de Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmacítica), tumores de células precursoras de linfocitos, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T, timoma, tumores de los linfocitos T y NK maduros, incluyendo leucemias de linfocitos T periféricos, leucemia de linfocitos T adultos/linfomas de linfocitos T y leucemia linfocítica granular grande, cánceres óseos osteolíticos y metástasis ósea.

Como se usa en el presente documento, un sujeto "en riesgo de desarrollar una enfermedad mediada por células derivadas de monocitos (MDCMD)" es un sujeto que tiene una predisposición para desarrollar la MDCMD, es decir, una predisposición genética para desarrollar la MDCMD o que se ha expuesto a condiciones que pueden dar como resultado una MDCMD. Un sujeto "que se sospecha que tiene una MDCMD" es uno que tiene uno o más síntomas de una MDCMD. A partir de lo anterior será claro que ni los sujetos "en riesgo de desarrollar una MDCMD" ni los sujetos "que se sospecha que tienen una MDCMD" son todos los individuos dentro de una especie de interés.

En cualquiera de los métodos anteriores, la MDCMC puede ser una causada por el sustrato y el reactivo de Fc sirve para prevenir o mejorar la MDCMC.

45 **Aplicaciones en ensayos inmunológicos**

Los biomiméticos inmunológicamente activos divulgados en el presente documento pueden usarse para llevar a cabo ensayos inmunológicos para probar las funciones de células inmunitarias para cuya modulación se diseñaron los biomiméticos inmunológicamente activos.

La señalización a través de rutas de receptor Fcγ de baja afinidad requiere de la agregación y reticulación del receptor en la superficie celular. Se supone que estos parámetros de agregación y reticulación se cumplen mediante la unión de Fab a una diana específica del antígeno con la consiguiente interacción entre la región Fc y los FcγR de baja afinidad en la superficie de las células respondedoras. En este contexto, los anticuerpos tienen el potencial de evocar respuestas celulares a través de dos rutas diferentes: 1. Interacción/bloqueo de Fab con/de una diana específica de epítipo y 2. Interacciones de Fc con FcR. A pesar de este conocimiento, los controles actuales para la mayoría de los estudios terapéuticos que usan anticuerpos monoclonales empleados *in vivo* no abordan de manera adecuada el potencial de las interacciones Fc: receptor Fcγ como contribuyentes a los efectos funcionales observados. Actualmente se emplean múltiples estrategias para eliminar interacciones Fc:FcR como variables de confusión. Por ejemplo, algunos estudios emplean Scv (regiones variables de cadena individual) o fragmentos Fab, que retienen la especificidad de epítipo pero que carecen de la región Fc. Estas estrategias están limitadas por la corta semivida de estos reactivos y por su potencial limitado para inducir señalización. Otros estudios emplean proteínas de fusión compuestas de un receptor o ligando fusionado a un fragmento Fc. Aunque estos tipos de estrategias ayudan a diferenciar los efectos específicos de Fab de aquellos observados con interacciones de receptor-ligando, no controlan de manera eficaz los efectos mediados por Fc. Las evaluaciones de agentes terapéuticos basados en anticuerpos en modelos animales también pueden emplear anticuerpos de control de

isotipo con un sitio de unión de Fab irrelevante. El razonamiento para esta elección está basado en la supuesta similitud funcional entre anticuerpos del mismo isotipo independientemente de su especificidad o afinidad de unión de Fab. Sin embargo, este uso de controles de isotipo irrelevantes tiene varios inconvenientes fundamentales:

- 5 1. Si los fragmentos Fab de estos anticuerpos no pueden unirse a un ligando o a un epítipo antigénico, es probable que los fragmentos Fc no estimulen la señalización a través del FcR de baja afinidad debido a la ausencia de reticulación del receptor Fcy. Por lo tanto, las diferencias funcionales observadas entre anticuerpos experimentales y de control no pueden atribuirse correctamente a la interacción de Fab con una diana específica de epítipo que carece de medios para reticular con el FcyR.
- 10 2. Si se producen estos isotipos en células que producen diferentes glucoformas o diferentes porcentajes relativos de glucoformas individuales que el anticuerpo progenitor, se alterará la unión a FcR tanto de alta como de baja afinidad, incluso si la afinidad de Fab es idéntica.

15 Aunque no hay un control perfecto para superar este problema, una opción es el uso de estradómeros de isotipo específico producido en las mismas células que los anticuerpos progenitores y administrados a una dosis proporcional a los niveles de expresión del epítipo usado como diana por el anticuerpo experimental. Por ejemplo, el control adecuado para un anticuerpo específico de epítipo producido en ratas podría ser un estradómero específico de isotipo de rata capaz de agregar receptor Fcy sobre la superficie de células efectoras.

- 20 En general, se expone una célula inmunitaria a una cantidad eficaz de un biomimético inmunológicamente activo para modular una actividad de una célula inmunitaria de un modo conocido y esta modulación inmunitaria se compara con un compuesto o molécula de ensayo para determinar si el compuesto de ensayo tiene una actividad moduladora inmunitaria similar.
- 25 En otra realización, los estradómeros agregados por calor, y las inmunoglobulinas agregadas pueden usarse como reactivos para controles de laboratorio en diversos ensayos inmunológicos descritos en el presente documento y conocidos por los expertos en la materia.

30 Los ensayos inmunológicos pueden ser ensayos *in vitro* o ensayos *in vivo* y pueden implicar a células inmunitarias humanas o no humanas usando un estradómero de especie emparejada o de especie no emparejada. En una realización, se lleva a cabo un ensayo inmunológico usando una cantidad eficaz del biomimético inmunológicamente activo para modular una actividad de una célula inmunitaria y comparando la modulación con una modulación de una célula inmunitaria por un compuesto de ensayo. El estradómero puede cumplir la función de un reactivo de control positivo en ensayos que implican la prueba de otros compuestos respecto de su efecto inmunológico. El ensayo puede comparar el efecto del anticuerpo monoclonal objeto en comparación con el estradómero respecto de la unión

35 del receptor de la célula Fcy y la respuesta funcional medida mediante cambios en el nivel de expresión de receptor, liberación de citocinas, y función, tal como mediante el uso de una reacción mixta de linfocitos. De esta manera, si un estradómero (que carece del Fab) genera una respuesta que es en parte similar a la del anticuerpo monoclonal, entonces el efecto del anticuerpo monoclonal es hasta cierto punto, no se debe a la especificidad de su Fab sino al efecto general de unión y reticulación de más de un receptor Fcy sobre la célula efectora.

40 Si la actividad biológica de un anticuerpo específico de especie y específico de isotipo se replica en su totalidad o en parte por un estradómero específico de especie y específico de isotipo entonces es evidente que la actividad Fc-receptor Fcy representa la proporción de la actividad biológica observada atribuible al estradómero específico de especie y específico de isotipo. Por lo tanto, los estradómeros específicos de especie y específicos de isotipo son

45 útiles para evaluar anticuerpos terapéuticos potenciales para determinar si y hasta qué grado la actividad biológica observada puede atribuirse a la porción Fab del anticuerpo de ensayo o a un efecto no específico de la porción Fc de la molécula que se une a y reticula a más de un receptor Fcy.

50 los estradómeros de la presente invención también son útiles en el bloqueo de unión no específica de receptores Fc durante inmunoensayos a base de anticuerpos tales como citometría de flujo, transferencia de Western, inmunohistoquímica y ensayo de inmunofluorescencia. Tradicionalmente, en ensayos tales como estos, los anticuerpos no específicos de la misma especie como el anticuerpo de ensayo se usan para bloquear la unión no específica a receptores Fc. Los estradómeros de la presente invención proporcionan un beneficio sobre medios tradicionales de bloqueo de Fc en que cada estradómero tiene múltiples sitios de unión FcR y, por lo tanto, se

55 pueden usar muchos menos estradómeros. Adicionalmente, puesto que el estradómero de la presente invención carece de la porción de unión a antígeno Fab del anticuerpo, la unión no específica a células muertas, por ejemplo, se observará como es habitual en el caso con IgG emparejada a especie de control.

60 Los estradómeros de la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que unen endotoxina con muy alta afinidad. Los kits y columnas de retención de endotoxinas estándar no retiran porcentajes significantes de la endotoxina fuertemente unida que proviene de estradómeros. Por lo tanto, las composiciones reivindicadas pueden ser útiles cuando actúan como una agrupación de unión para endotoxina una herramienta útil para la retención de endotoxinas en preparaciones tanto farmacéuticas como de laboratorio. Esto resulta beneficioso en que los complejos formados entre la endotoxina y los estradómeros tienen una suficientemente alta afinidad para retirar

65 eficazmente endotoxina de una preparación o composición farmacéutica. En una realización, los complejos de endotoxina-estrado-mero se retiran de la composición mediante filtración.

Todas las referencias citadas en el presente documento se han incorporado por referencia en su totalidad.

Ejemplos

Ejemplo 1 Producción y purificación de estradómeros

Se usaron células HEK293F (Invitrogen, Carlsbad, CA) o células de ovario de hámster chino (CHO) para la expresión estable de G045/M045 y G051. Las células HEK293F o CHO se cultivaron en suspensión para escalar la expresión proteica.

Los genes que codifican G045c (SEQ ID NO:4), G045old (SEQ ID NO:7) G051 (SEQ ID NO:18), G019 (SEQ ID NO:8), G028 (SEQ ID NO:9), G046 (SEQ ID NO:10), G075 (SEQ ID NO: 20), G076 (SEQ ID NO:21), G096 (SEQ ID NO:28), G098 (SEQ ID NO:24), G089 (SEQ ID NO:27) o las secuencias murinas correspondientes de los anteriores estradómeros se clonaron en un vector que contenía un gen de resistencia a neomicina tal como pcDNA3.3 de Invitrogen (Carlsbad, CA) y con el control transcripcional del promotor de CMV para facilitar el alto nivel de expresión de G045 o G051. Se aisló ADN de plásmido para transfección a partir de cultivo bacteriano usando un kit de aislamiento de ADN de plásmido libre de endotoxinas (Nucleobond, Macherey-Nagel). G045c/ G045antigua y G051 que codifican ADN de plásmido se linealizó con enzima de restricción y se transfectó en células 293-F o células CHO. Después de la transfección de células positivas que expresan G045c, G045antigua o G051 se seleccionaron con Geneticina/G418 para obtener una agrupación de células transfectadas. Para obtener una línea celular clonal de células establemente transfectadas se diluyó a 1-2 células por pocillo en una placa de 96 pocillos a partir de la cual se obtuvieron clones de células únicas de la línea celular estable. Clones de célula única se cribaron mediante ELISA para su expresión proteica. Se cultivan clones de células únicas y G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098 o G089, proteína se cultiva a partir de medio como proteína secretada.

Para la producción de proteína G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098, o G089 mediante transfección transitoria de células HEK293 o células CHO se transfectaron con ADN que codificaba las proteínas G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098, o G089 bajo control de un promotor de CMV para asegurar el alto nivel de expresión de la proteína. La transfección se realizó con uno de los varios reactivos de transfección disponibles en el mercado. La proteína G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098 o G089 secretada se recoge a partir del medio de cultivo celular 4-5 días después de su transfección.

Se filtró medio de cultivo celular de líneas celulares o bien transfectadas transitoriamente o estables usando un filtro de 0,22 μ m y se ajustó a pH 7,2 con 1 volumen de tampón de unión (20 mM de fosfato de sodio pH 7,2 + 150 mM de NaCl) y se purificó mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de afinidad de proteína A HiTrap Mabselect usando sistema de purificación de AKTAXpress. (GE life sciences) Después de la elución de 0,1 M de citrato de sodio pH 3,3 se purificó proteína sobre una columna de desalación 26/20 HiPrep para el intercambio de tampón.

Para la purificación adicional de proteína G045c, G045antigua, G051, G019, G028, G046, G075, G076, G096, G098, o G089 se purifica mediante filtración por gel sobre una columna de filtración de gel HiLoad Superdex 200 (GE Lifesciences) en 50 mM de Tris-HCL pH7,5 + 150 mM NaCl seguido por purificación sobre columna de intercambio iónico de Mono S (GE Lifesciences). La purificación de intercambio iónico se realiza en 20 mM de tampón MES pH 6 con un gradiente 0-1 M de NaCl. Después de la cromatografía la proteína se ajusta a PBS mediante diálisis. Un esquema del estradómero de g045c resultante se ilustra en la Figura 1.

Para evaluar la capacidad de multimerización de la proteína G045c resultante, se llevó a cabo un gel de poliacrilamida al 10 % que contenía concentraciones iguales de G045c producidas por el método anterior y G045antigua, producida por el método previamente descrito en el documento WO 2008/151088 que contiene las secuencias de clonación extrañas. Sorprendentemente, la retirada de los fragmentos extraños llevó a un aumento notable en multimerización en G045c en comparación con G045antigua con G045c mostrando una concentración mucho mayor de multímeros ordenados superiores en comparación con G045antigua. (Véase la figura 2A).

La formación de multímeros en G045antigua frente a G045c se analizó usando un sistema de formación de imágenes de Gel-DocIT. Después del examen de densidad de las imágenes de gel se evaluó la cantidad de proteína en cada banda de gel. Sorprendentemente, la formación de multímeros en la muestra de G045antigua se estimó que era aproximadamente del 27,9 % mientras que la retirada de los fragmentos extraños para generar estradómeros naturalmente unidos llevó a la formación de multímeros en la muestra G045c que fue significativamente superior y se estimó que era aproximadamente del 73,8 % de la proteína total. (Véase la Figura 2B).

Ejemplo 2: Eficacia potenciada de M045c en comparación con M045antigua en un modelo de ratón de artritis

Se llevó a cabo la evaluación de la eficacia de M045c en comparación con la de M045antigua en artritis inducida por colágeno. En el día 0 y día 21 se inmunizaron ratones DBA1/J con colágeno bovino tipo II (Chondrex, Inc., Cat.

20021) con una solución de 4 mg/ml emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Cat #5506). Los ratones se pesaron semanalmente y se puntuaron según los síntomas de la artritis. Cada pata se puntuó y la suma de todas las puntuaciones se registró como el Índice Artrítico (AI). El AI máximo posible fue de 16 del siguiente modo: 0 = sin efectos visibles de artritis 1 = edema y/o eritema de un dígito 2 = edema y/o eritema de 2 articulaciones 3 = edema y/o eritema de más de 2 articulaciones 4 = artritis grave de la pata entera y dígitos incluida deformación de la extremidad y anquilosis de la articulación. Iniciándose en el día 22 (día de tratamiento 0) se seleccionaron diez de los ratones inmunizados con colágeno en grupos de tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se designaron diez ratones no enfermos como el grupo no enfermo. Se midió el índice de artritis durante 14 días de tratamiento después de los cuales se sometió a eutanasia a los ratones. Para el grupo de control positivo diez de los ratones se escogieron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron oralmente con 10 ml/kg de prednisolona cada día. Para el grupo tratado con M045c o M045antigua 20 de los ratones se seleccionaron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron cada 4º día (día 0, día 4, día 8 y día 12) con 400 µg M045c o M045old (17,4 mg/kg).

Los ratones tratados con M045c tenían estadísticamente menos enfermedad grave en comparación con la de los ratones tratados con M045antigua en casi todos los puntos de tiempo sometidos a ensayo. (Véase la Figura 3). Por lo tanto, la retirada del fragmento de clonación de 16 aminoácidos entre la secuencia líder y Fc de IgG1 lleva a no solo una mayor formación de multímeros, sino también a una eficacia aumentada frente a enfermedades inflamatorias.

La evaluación de la eficacia de M045c, M019, M028, M046 y M051 en artritis inducida por colágeno se llevó a cabo de forma similar y se comparó con la eficacia de prednisolona. Se indujo CIA en ratones tal como se ha descrito anteriormente y los ratones se trataron empezando el día 22 después de la inducción de CIA con 400 µg de M045, M019, M028, M046 o M051 por vía intravenosa dos veces a la semana o 10 mg/kg de prednisolona cada día y se puntuó durante dos semanas según su AI, tal como anteriormente. Los ratones que recibían cada una de los estradómeros sometidos a ensayo tuvieron estadísticamente menos enfermedad grave que los controles tratados con PBS (véase la Figura 9).

Ejemplo 3: Efecto sinérgico de M045 y Prednisolona en un modelo de ratón de artritis

Se llevó a cabo la evaluación de la eficacia de M045c combinada con baja dosis de prednisolona en un modelo de artritis inducida con colágeno. En resumen, en el día 0 y día 21 se inmunizaron ratones DBA1/J con colágeno bovino tipo II (Chondrex, Inc., Cat. 20021) con una solución de 4 mg/ml emulsionada con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Cat #5506). Los ratones se pesaron semanalmente y se puntuaron según los síntomas de la artritis. Cada pata se puntuó y la suma de todas las puntuaciones se registró como el Índice Artrítico (AI). El AI máximo posible fue de 16 del siguiente modo: 0 = sin efectos visibles de artritis 1 = edema y/o eritema de un dígito 2 = edema y/o eritema de 2 articulaciones 3 = edema y/o eritema de más de 2 articulaciones 4 = artritis grave de la pata entera y dígitos incluida deformación de la extremidad y anquilosis de la articulación. Iniciándose en el día 22 (día de tratamiento 0) se seleccionaron diez de los ratones inmunizados con colágeno en grupos de tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se designaron diez ratones no enfermos como el grupo no enfermo. Se midió el índice de artritis durante 14 días de tratamiento después de los cuales se sometió a eutanasia a los ratones. Para el grupo de control positivo diez de los ratones se escogieron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron oralmente con 10 ml/kg de prednisolona cada día. Para el grupo tratado con M045c o diez de los ratones se seleccionaron en el tratamiento basándose en el AI promedio (3,3) y se dosificaron cada 4º día (día 0, día 4, día 8 y día 12) con 400 µg de M045c (17,4 mg/kg). Para medir la sinergia entre prednisolona y M045c se trató un grupo con baja dosis de prednisolona 2 mg/kg cada día, un grupo se trató con baja dosis de M045c 200 µg/dosis dosificando cada 4º día y un grupo se dosificó con baja dosis de prednisolona 2 mg/kg más baja dosis de M045c 200 µg/dosis dosificando cada 4º día.

Mientras que una alta dosis de prednisolona (10 mg/kg) fue eficaz como único agente en la mejora de artritis inducida por colágeno, una baja dosis de prednisolona (2 mg/kg) fue solo marginalmente eficaz. Adicionalmente, una baja dosis de M045c (200 µg/dosis o 9,1 mg/kg) también fue ineficaz en la reducción de la gravedad de la enfermedad en comparación con controles sin tratar. Sin embargo, sorprendentemente, los ratones tratados con una baja dosis de prednisolona combinados con una baja dosis de M045c mostraron una disminución sinérgica (más que aditivo) en gravedad de enfermedad cuando se compararon con los grupos de tratamiento de prednisolona y M045c solo. (Véase la Figura 4).

Ejemplo 4: Análisis de unión de IgG2A, M045, M046, M028, M019 y G051 a receptores de ratón.

Los receptores FcγRIIIA, FcγRIIB y SIGN-R1 se inmovilizaron en un chip de CM4 usando inmovilización de amina a 560, 500 y 1000UR, respectivamente para compensar el tamaño de la proteína. M045c (SEQ ID NO:11), M046 (SEQ ID NO:15), M019 (SEQ ID NO:13) y M028 (SEQ ID NO: 14) se diluyeron en serie de 500 nM a 1,9 nM en tampón de ejecución de HBSS-EP y se inyectó a 20 µl/min durante 180 s. Se consiguió la regeneración mediante una inyección de 10 s de 1 mM de MgCl a 100 µl/min, seguida por un breve lavado con tampón de ejecución. Se calcularon los KD usando software de evaluación T100.

Para FcγR3A y FcγR2b de ratón, los homodímeros Fc de IgG2a de ratón se unen con mejor afinidad y disociación más rápida en comparación con cada una de los estradómeros sometidos a ensayo. Para SIGN-R1 de ratón, los homodímeros Fc de IgG2a de ratón no se unen de forma apreciable mientras que los estradómeros selectivos se asocian a grados variantes y disocian lentamente. (Véase la Figura 5).

Se evaluaron las fracciones de M045c en este modelo. M045F se fracciona en gel, en primer lugar, usando un sistema de purificación de proteínas de AktaXpress y una columna de grado de prep. GE HiLoad 16/60 Superdex 200. La Fracción 1 (M045 F1) contiene el componente de peso molecular más alto de los multímeros de M045 después de la separación de multímeros según su tamaño. M045 F2 es el componente multímero con peso molecular inferior y M045 F3 es la fracción de homodímeros del estradómero. Para FcγRIIIa, FcγRIIb de ratón (véase la Figura 6a), y SIGN-R1 (véase la Figura 6b) la afinidad de unión es la más alta con una lenta tasa de disociación para M045 F1 en comparación con otras fracciones o con Fc de IgG2a de control.

Para evaluar la unión de G051, se realizó un ensayo de interferometría de biocapa sobre un Octet 96 Red Instrument (ForteBio, Menlo Park CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Data Acquisition User Guide 6.4 ForteBio). Para el análisis de unión de proteína de unión, FcγRII de ratón marcado con His (sistema R&D cat# 1460-CD) y FcγRIII sistema R&D cat# 1960) se cargaron por separado sobre Biosensores anti-penta-His (ForteBio cat # 18-5077) a 10ug/ml en 1X tampón de análisis cinético (ForteBio cat #18-5032). Para análisis de unión de proteína humana, FcγRIIb humano marcado con His (sistema R&D cat# 1875-CD) y FcγRIIIa sistema R&D cat# 4325-Fc) se cargó por separado sobre Biosensores anti-penta-His (ForteBio cat # 18-5077) a 10ug/ml en 1X tampón de análisis cinético (ForteBio cat #18-5032). A continuación se midió la asociación de proteína de la carga de la punta del sensor mediante transferencia de puntos a preparaciones de o bien la fracción monomérica (sobre un intervalo de concentraciones) o bien las fracciones multiméricas (sobre un intervalo de concentraciones) en 1X de tampón de análisis cinético y se midió la disociación mediante la transferencia de puntas de sensor a 1X de tampón cinético. El análisis fue tal como se ha descrito (Data Analysis User Guide 6.4ForteBio). El análisis se estandarizó como se ha descrito anteriormente asignando un MW de 50 kD a homodímeros y 150 kD a todas las otras preparaciones de proteínas.

La Tabla 2 muestra que las fracciones de multímeros de estradómeros más grandes de M051 se unen con mayor afinidad y avidez y disociación más lenta que fracciones que multímeros más pequeñas que, a su vez, se unen con mayor afinidad y avidez y disociación más lenta que la fracción de homodímeros.

Tabla 2

Muestra	KD	Kon	Kdis	Rmax	R2	Fracción
M051	6,55E,-9	8,53E,+5	5,59E,-3	0,394	0,987	
Monómero M051	9,59E,-7	7,24E,+5	6,94E,-1	0,373	0,985	2A11
Dímero M051	1,25E,-8	1,45E,+6	1,81E,-2	0,4129	0,987	2H10
Trímero M051	3,36E,-9	1,28E,+6	4,28E,-3	0,5093	0,996	3E12
Tetrámero M051	1,39E,-9	1,56E,+6	2,04E,-3	0,567	0,996	3H4
Multímero M051	1,77E,-9	4,19E,+6	1,15E,-4	0,6237	0,998	4F4

Para evaluar la cinética de unión de G045 o G051 con respecto a G001 (Fc de IgG1 nativa), se llevó a cabo un ensayo de interferometría de biocapa sobre un Octet 96 Red Instrument, tal como anteriormente. Se midió la unión de G045 y G001 a FcγRIIb humano FcγRIIIa (tanto las variantes F como V), FcγRIIIa cinomólogo, FcγRIIb cinomólogo y FcγRIII cinomólogo. G045 tiene una afinidad de unión significativamente superior con disociación más lenta y muestra de avidez a cada uno de los receptores sometidos a ensayo en comparación con G001. (véase las Tablas 3 y 4).

Tabla 3

Receptor	Proteína	KD	kon	kdis	R max	R2
FcγRIIb humano	G045	1,42E,-9	7,99E,+5	1,14E,-3	0,7166	0,999
FcγRIIIa humano (F)	G045	1,22E,-9	6,20E,+5	7,567E,-4	0,7507	0,999
FcγRIIIa humano (V)	G045	2,95E,-10	6,07E,+5	1,79E,-4	0,9182	0,999
FcγRIIb cinomólogo	G045	1,19E,-9	7,56E,+5	8,81E,-4	0,7125	0,999
FcγRIIIa cinomólogo	G045	2,58E,-10	6,17E,+5	1,59E,-4	1,0356	0,999
FcγRIIb de ratón	G045	5,42E,-10	1,21E,+6	6,56E,-4	0,4555	0,998
FcγRIII de ratón	G045	8,00E,-10	1,03E,+6	8,23E,-4	0,519	0,998

Tabla 4

Receptor	Proteína	KD	kon	kdis	R max	R2
FcγRIIb humano	G001	1,31E,-6	6,86E,+5	8,99E,-1	0,19	0,986

FcyRIIIa humano (F)	G001	2,43E,-6	1,11E,+5	2,69E,-1	0,383	0,990
FcyRIIIa humano (V)	G001	1,14E,-6	1,18E,+5	1,35E,-1	0,7265	0,995
FcyRIIb cinomólogo	G001	2,04E,-6	3,94E,+5	8,06E,-1	0,3456	0,988
FcyRIIIa cinomólogo	G001	9,15E,-7	1,24E,-5	1,14E,-1	0,837	0,995
FcyRII de ratón*	G001	1,51E,-6	2,56E,+5	3,87E,-1	0,1173	0,963 *
FcyRIII de ratón *	G001	4,18E,-6	1,18E,+5	4,91E,-1	0,1026	0,904 *

De manera similar, se midió la unión de G051 y G001 a FcyRIIb humano y FcyRIIIa. G051 tiene una afinidad de unión significativamente superior con disociación más lenta y muestra de averse a cada uno de los receptores sometidos a ensayo en comparación con G001. (Véase la Tabla 5).

5

Tabla 5

Proteína	Receptor	KD	Kon	Kdis	Rmax	R2
G001	FcyRIIb	2,99E,-06	3,72E,+05	1,11E,+00	0,3152	0,986
G001	FcyRIIIa	6,77E,-07	1,64E,+05	1,11E,-01	0,6535	0,991
G051	FcyRIIb	4,39E,-08	7,10E,+05	3,12E,-02	0,2868	0,991
G051	FcyRIIIa	2,30E,-08	2,83E,+05	6,50E,-03	0,886	0,996

Ejemplo 5: Los compuestos de estradómeros naturalmente unidos son eficaces en el tratamiento/prevención de ITP

10

Para elucidar el efecto de estradómeros en púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) se sometieron a ensayo estradómeros en un modelo de ratón preventivo de ITP. Se indujeron bajos recuentos plaquetarios seguido de la exposición a anticuerpo anti-IIb de integrina de ratón que recubre receptores de integrina sobre plaquetas. En resumen, ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad (Charles River) se inyectaron en la vena caudal con estradómero o control el día 1 seguido de extracción de sangre y recuento plaquetario. En el día 2 después de la extracción de sangre y recuentos plaquetarios los ratones se trataron con MWReg30 (BD Pharmingen cat #553847) proporcionado a una concentración de 2 µg de anticuerpo en 200 µl de tampón fosfato salino mediante inyección intraperitoneal para inducir pérdida plaquetaria. La extracción de sangre para los recuentos plaquetarios e inyecciones MWReg30 continúan los días 3, 4 y 5. El control positivo de IVIG se dosifica diariamente en los días 2 a 5 y se tomaron los recuentos plaquetarios con el hemocitómetro Drew Scientific Hemavet 950, M045c y sus trañones se dosifican una vez el día 2. Se recoge sangre mediante hendidura de la vena caudal y mezclándose con tampón de citrato para evitar la coagulación.

15

20

25

M045c es significativamente protector en este modelo con respecto a no tratamiento de fármaco de ITP de control y Fc de IgG2a de control y es comparable tanto a terapia preventiva de IVIG y ratones que no recibieron la agresión de MWReg30 (véase, la Figura 7). Se realizaron fracciones de M045c como se describe en el Ejemplo 4. La fracción M045 de Fracción 1 es significativamente protectora en este modelo con respecto a control de ITP sin tratamiento de fármacos mientras que M045 Fracción 3 no lo es.

30

Ejemplo 6: Retiración de complejos de endotoxinas con complejos de estradómeros naturalmente unidos

Para retirar endotoxina, se ajustará una solución de proteína que contiene endotoxinas que contiene una proteína de interés a pH 7,2 con 1 volumen de tampón de unión (20 mM de fosfato de sodio pH 7,2 +150 mM de NaCl) después de mezclar estradómero de unión de endotoxinas a la solución. Para retirar la endotoxina, la solución que contiene la proteína se aplicará a una columna de cromatografía de afinidad (columna de afinidad de proteína A HiTrap Mabselect, GE Life Sciences). La endotoxina unida a estradómero se unirá a la columna de afinidad y la proteína libre de endotoxinas purificadas se eluirá en el flujo a través de fracciones.

35

40

En un enfoque alternativo al uso de estradómeros para atrapar endotoxina, perlas magnéticas recubiertas con proteína A (New England BioLabs, MA) se mezclarán en la solución de proteínas que contiene endotoxinas junto con estradómeros de unión de endotoxinas y el estradómero unido se retirará mediante separación magnética.

Ejemplo 7: Uso de complejos de estradómero naturalmente unidos para bloqueo de Fc en ensayos inmunológicos

45

Mejora de la sensibilidad y especificidad de herramientas de investigación a base de anticuerpos y diagnóstico clínico. La utilidad de investigación y utilidad de diagnóstico clínico de anticuerpos queda limitada por unión no específica. Esto se puede producir, por ejemplo, mediante la unión de la porción Fc de anticuerpos monoclonales o policlonales a receptores Fc gamma de alta afinidad y otros receptores de unión de Fc sobre células que incluyen células inmunitarias y tumores o mediante la unión de agregados de anticuerpos o agregados celulares recubiertos con anticuerpo a receptores Fc gamma de baja afinidad.

50

Para demostrar la capacidad de los estradómeros de bloquear las interacciones de receptores Fc gamma con anticuerpos anti-Fc gamma específicos realizamos una citometría de flujo y se comparó dosis en aumento de estradómero humano de G045c con G001, un monómero homodimérico Fc de IgG1, en su capacidad de bloquear anticuerpo anti-FcγR que se une a FcγRs conocidos por estar presentes en células específicas. Se encontró que los estradómeros bloqueaban eficazmente la unión de anticuerpos anti-FcγR que se unen a FcγR con respecto a Fc de IgG1 de control y para hacer lo mismo de un modo dependiente de la concentración (véase la Figura 8).

Debido a su muy alta afinidad de unión de receptores Fc gamma y otros receptores que unen regiones Gc de inmunoglobulina, las estradómeros de la invención son eficazmente en el bloqueo de la unión e interacción incluso de anticuerpos monoclonales de receptores anti-Fc gamma específicos. Los estradómeros son, por lo tanto, útiles como reactivos de control para disminuir la unión de anticuerpos no específica de anticuerpos administrados tanto en el entorno de las herramientas de investigación como el entorno de diagnóstico clínico.

Ejemplo 8: Los compuestos de estradómero naturalmente unidos son eficaces en el tratamiento de neuritis autoinmunitaria experimental

La evaluación de la eficacia de M045c y M051, en cada caso comparada con la de IVIg y a albúmina, se realizó en un modelo de rata de neuritis autoinmunitaria experimental (EAN). Los modelos de EAN murinos son modelos animales ampliamente usados de poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria. En resumen, 45 ratas Lewis se inmunizaron con mielina de nervio periférico bovina completa y se distribuyó al azar en tres grupos. Al inicio de las deficiencias clínicas, que es, en general, pérdida de peso empezando el día 9 o 10, 15 ratas por grupo de tratamiento se trataron con (1 gm / 1 Kg de peso corporal), M045 (20 mg/Kg) o M051 (17,5 mg/Kg) o con albúmina todas proporcionados como dos dosis IV en dos días consecutivos. Todos los fármacos se administraron por vía intravenosa mediante inyección en la vena caudal.

Se evaluaron ratas EAN clínicamente, electrofisiológicamente e histológicamente. La gravedad de la enfermedad clínica se evaluó mediante graduación clínica diaria y mediante cambios de peso. Los estudios electrofisiológicos incluían el examen de la amplitud de los potenciales de acción muscular del compuesto (CMAP) y velocidad de conducción motora (MCV). En el día 15 en el máximo de la enfermedad, se sacrificaron cinco ratas de cada grupo, se recogieron los nervios ciáticos y se analizaron los cambios histopatológicos. La eficacia de tratamiento se comparó entre los grupos IVIg y albúmina y M045c recombinante o grupos M051 y albúmina.

Las ratas que recibían la M045c de estradómero sometida a ensayo tuvieron estadísticamente menos enfermedad grave que los controles tratados con albúmina (véase la Figura 12). Ratas EAN tratadas con albúmina presentaron una mortalidad superior (4 de 15) en comparación con tratadas con IVIg (1 de 15) y con ratas tratadas con M045c (0 de 15). Los animales que recibieron tratamiento con M045c y IVIg mostraron significativamente menos pérdida notable de peso. Hubo una mejora estadísticamente significativa en tanto velocidad de conducción motora (MCV) como las amplitudes de CMAP distales y proximales en ratas tratadas con IVIg y M045c en comparación con aquellas tratadas con albúmina. Las ratas tratadas con albúmina mostraron más pérdida axonal grave y degeneración axonal activa en nervios ciáticos en comparación con ratas tratadas con IVIg y M045c. Por lo tanto, la M045c de estradómero demostró mortalidad, eficacia de peso, clínica, electrofisiológica e histopatológica en comparación con albúmina, comparable con la eficacia demostrada por la IVIg estándar de oro clínica a aproximadamente el 2 % de la dosis de IVIg.

En un experimento por separado con 11 ratas por grupo de ensayo, las ratas que recibían la M051 de estradómero sometida a ensayo tuvieron estadísticamente menos enfermedad grave que los controles tratados con albúmina (véase la Figura 11). En este estudio, 7 de 11 animales murió en el grupo de control (albúmina) en comparación con 4 en el grupo de M051. Las ratas que recibían o bien IVIg o bien M051 demostraron significativamente menos pérdida de peso en comparación con ratas que recibían control de albúmina. Las ratas que recibían o bien IVIg o M051 demostraron una mejora significativa en puntuaciones clínicas en comparación con ratas que recibían control de albúmina. Hubo una mejora estadísticamente significativa en tanto MCV como en la amplitud de CMAP después del tratamiento con IVIg o M051. Por lo tanto, la M051 de estradómero demostró mortalidad significativa, eficacia de peso, clínica y electrofisiológica en comparación con albúmina, comparable con la eficacia demostrada por la IVIg estándar de oro clínica a aproximadamente el 2 % de la dosis de IVIg.

Ejemplo 9: Compuestos de estradómeros naturalmente unidos que contienen mutaciones Fc muestran unión aumentada a FcγR y son eficaces para el tratamiento en un modelo de ratón de artritis

La unión de estradómeros que contenían mutante de Fc, G075 (SEQ ID NO:20) y G076 (SEQ ID NO:21) a FcγRIIIa, FcγRIIb y FcγRIIa se llevó a cabo mediante ensayo de unión de Biacore como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4. G075 mostró un aumento de unión a FcγRIIIa y una reducción de unión a FcγRIIa y FcγRIIb mientras que G076 mostró una disminución de unión a FcγRIIIa y un aumento de unión a FcγRIIa y FcγRIIb. (Véanse las Figuras 10A y B).

La evaluación de la eficacia de M075 de estradómero (SEQ ID NO:22), M076 (SEQ ID NO:23) y M098 (SEQ ID

NO:25) que contenía mutante Fc sobre un modelo de ratón de artritis se determinó a continuación como se ha hecho en el Ejemplo 3 anterior. Los estradómeros que contenían mutante Fc se compararon con el vehículo y M045c. Tanto M098 y M075 fueron significativamente más eficaces en la inhibición de la progresión de CIA, mientras que el estradómero de M076 no lo fue. (Véanse las Figuras 13 A y B). Esperamos que otras mutaciones de Fc de inmunoglobulina que se conocen por alterar la unión Fc-FcR individual o que alteran la citotoxicidad dependiente del complemento será similarmente complementaria con los estradómeros que comprenden Fc de IgG1 y que presente Fc de IgG1 con respecto a receptores Fc.

Lista de secuencias

10 <110> Block, David S.
Olson, Henrik

15 <120> Proteínas de fusión de fragmentos de proteínas humanas naturales para crear composiciones Fc de inmunoglobulina multimerizada de manera ordenada

<130> GLIK-006/01US

20 <150> US 61/368,465
<151> 28/07/2010

<160> 30

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 1

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

Gly	Ser	Thr	Gly
			20

35 <210> 2
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 2

ES 2 719 623 T3

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

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 719 623 T3

<400> 3

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

5 <210> 4
<211> 264
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 4

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

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

ES 2 719 623 T3

35	40	45																	
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val				
50						55					60								
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe				
65					70					75					80				
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro				
				85					90					95					
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr				
			100					105					110						
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val				
		115					120					125							
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala				
	130					135					140								
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg				
145					150					155					160				
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly				
				165					170					175					
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro				
			180					185					190						
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser				
		195					200					205							
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln				
	210					215					220								
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His				
225					230					235					240				
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Lys	Cys				
				245					250					255					
Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro												
			260																

<210> 5
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 719 623 T3

<400> 5

Gly Gly Gly Ser Ile Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu
1 5 10 15

Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu
20 25 30

Ile Gly Glu Arg Gly His Gly Gly Gly
35 40

5

<210> 6

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 6

Asp Ala Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Glu Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
35 40 45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
65 70 75 80

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
100 105 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
115 120 125

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

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

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

ES 2 719 623 T3

165

170

175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
180 185 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
195 200 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
210 215 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 7

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 719 623 T3

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

ES 2 719 623 T3

130		135		140
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln				
145		150		155
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala				
		165		170
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr				
		180		185
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu				
		195		200
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser				
		210		215
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser				
		225		230
Leu Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys				
		245		250
Pro Pro Cys Pro				
		260		

<210> 8
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1	5
Gly Ser Thr Gly Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	
	20
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	
	35
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
	50
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
	65
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	

ES 2 719 623 T3

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

<210> 9
<211> 294
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 719 623 T3

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

Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Ile Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu
 20 25 30

Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile

ES 2 719 623 T3

35	40	45															
Lys	Lys	Leu	Ile	Gly	Glu	Arg	Gly	His	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Pro		
50						55					60						
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
65					70					75					80		
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
				85					90					95			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
			100					105					110				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
		115					120					125					
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		
	130					135					140						
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp		
145					150					155					160		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro		
				165					170					175			
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu		
			180					185					190				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn		
		195					200					205					
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile		
	210					215					220						
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr		
225					230					235					240		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys		
				245					250					255			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys		
			260					265					270				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu		
		275					280					285					

ES 2 719 623 T3

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290

<210> 10
<211> 289
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

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

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

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

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

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

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

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

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

ES 2 719 623 T3

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Ile Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
260 265 270

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg
275 280 285

Gly

<210> 11

<211> 266

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

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

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
50 55 60

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

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
85 90 95

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

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
115 120 125

ES 2 719 623 T3

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
130 135 140

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

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
165 170 175

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
180 185 190

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

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
210 215 220

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
225 230 235 240

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Glu Arg
245 250 255

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
260 265

<210> 12
<211> 278
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 12

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

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser
20 25 30

Arg Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
35 40 45

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
50 55 60

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
65 70 75 80

ES 2 719 623 T3

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
85 90 95

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
100 105 110

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
115 120 125

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
130 135 140

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
145 150 155 160

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
165 170 175

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
180 185 190

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
195 200 205

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
210 215 220

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
225 230 235 240

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
245 250 255

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Glu Arg Lys Cys Cys Val
260 265 270

Glu Cys Pro Pro Cys Pro
275

<210> 13
<211> 265
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 13

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

ES 2 719 623 T3

Gly	Ser	Thr	Gly	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	20	25	30
Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	35	40	45
Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	50	55	60
Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	65	70	75
Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	85	90	95
Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	100	105	110
Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	115	120	125
Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	130	135	140
Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	145	150	155
Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	165	170	175
Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	180	185	190
Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	195	200	205
Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	210	215	220
Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	225	230	235
Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	245	250	255
Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys								260	265	

ES 2 719 623 T3

5 <210> 14
<211> 287
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 14

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

Gly Ser Thr Gly Ser Ile Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile
20 25 30

Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys
35 40 45

Leu Ile Gly Glu Arg Gly Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
50 55 60

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
65 70 75 80

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

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

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
115 120 125

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

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
145 150 155 160

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile
165 170 175

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

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

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
210 215 220

ES 2 719 623 T3

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
245 250 255

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
260 265 270

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 15
<211> 291
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 15

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

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
50 55 60

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

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
85 90 95

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

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
115 120 125

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
130 135 140

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

ES 2 719 623 T3

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
165 170 175

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
180 185 190

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

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
210 215 220

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
225 230 235 240

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Ile Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
260 265 270

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
275 280 285

Glu Arg Gly
290

<210> 16
<211> 299
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16

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

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser
20 25 30

Ser Ile Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
35 40 45

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
50 55 60

Arg Gly Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys
65 70 75 80

5

10

ES 2 719 623 T3

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

<210> 17
 <211> 753
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

ES 2 719 623 T3

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggg      60
gagcgcaaat gttgtgtgga gtgccaccg tgccagcac ctgaactcct ggggggaccg      120
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag      180
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      240
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc      300
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag      360
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa      420
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg      480
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc      540
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg      600
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag      660
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag      720
aagagcctct ccctgtcccc gggtaaataa taa                                  753

```

<210> 18
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 18

```

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

```

```

Gly Ser Thr Gly Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
                20                               25                               30

```

```

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        35                               40                               45

```

```

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50                               55                               60

```

```

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65                               70                               75                               80

```

```

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                        85                               90                               95

```

```

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
                        100                               105                               110

```

```

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

```

ES 2 719 623 T3

115		120		125
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln				
130		135		140
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met				
145		150		155
				160
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro				
		165		170
				175
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn				
		180		185
				190
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu				
		195		200
				205
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val				
		210		215
				220
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln				
		225		230
				235
				240
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
		245		

<210> 19
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 719 623 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

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

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 20
<211> 264
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 719 623 T3

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

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

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

ES 2 719 623 T3

85

90

95

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

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

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Arg Lys Cys
245 250 255

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
260

<210> 21
<211> 264
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

ES 2 719 623 T3

35	40	45															
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		
50						55					60						
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe		
65					70					75					80		
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro		
				85					90					95			
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Ala	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr		
			100					105					110				
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val		
		115					120					125					
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		
	130					135					140						
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		
145					150					155					160		
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		
				165					170					175			
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro		
			180					185					190				
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser		
		195					200					205					
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln		
	210					215					220						
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
225					230					235					240		
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Lys	Cys		
				245					250					255			
Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro										
				260													

<210> 22
 <211> 266
 <212> PRT

ES 2 719 623 T3

<213> Mus sp.

<400> 22

```

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

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
20          25          30

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35          40          45

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
50          55          60

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

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
85          90          95

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

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
115         120         125

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
130         135         140

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

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
165         170         175

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
180         185         190

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

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
210         215         220

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
225         230         235         240

```

ES 2 719 623 T3

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Glu Arg
245 250 255

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
260 265

<210> 23
<211> 266
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 23

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

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
50 55 60

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

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
85 90 95

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

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
115 120 125

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
130 135 140

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

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
165 170 175

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
180 185 190

ES 2 719 623 T3

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

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
210 215 220

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
225 230 235 240

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Glu Arg
245 250 255

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
260 265

<210> 24
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

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

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

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

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

5

10

ES 2 719 623 T3

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Pro Pro Gly
245 250 255

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro
260 265 270

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
275 280

<210> 25
<211> 284
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 25

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

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
50 55 60

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

ES 2 719 623 T3

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
85 90 95

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

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
115 120 125

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
130 135 140

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

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
165 170 175

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
180 185 190

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

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
210 215 220

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
225 230 235 240

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Gly Pro
245 250 255

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
260 265 270

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
275 280

<210> 26

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio de multimerización de GPP

<400> 26

Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly

ES 2 719 623 T3

1 5 10 15

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
20 25 30

<210> 27
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

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

Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
35 40 45

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

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

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
100 105 110

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

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
130 135 140

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

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

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

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

ES 2 719 623 T3

195

200

205

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Pro Pro Gly
245 250 255

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro
260 265 270

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
275 280

<210> 28

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

ES 2 719 623 T3

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

ES 2 719 623 T3

130

135

140

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
165 170 175

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
180 185 190

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
195 200 205

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
210 215 220

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
245 250 255

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
260 265 270

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280

<210> 29

<211> 284

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 29

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

Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
20 25 30

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
50 55 60

Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val

5

10

ES 2 719 623 T3

65		70		75		80									
Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr
				85					90					95	
Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala
			100					105					110		
Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys
		115					120					125			
Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser
	130					135					140				
Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro
145					150					155					160
Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val
				165					170					175	
Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly
			180					185					190		
Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
		195					200					205			
Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp
	210					215					220				
Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His
225					230					235					240
Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro
				245					250					255	
Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro
			260				265						270		
Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro				
		275				280									

<210> 30
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 30

ES 2 719 623 T3

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

ES 2 719 623 T3

Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His
260 265 270

Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
275 280

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende SEQ ID NO:4.
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1 en donde la secuencia líder está escindida.
3. Una composición que comprende multímeros de dímeros de los polipéptidos de las reivindicaciones 1 o 2, en donde los multímeros están presentes a un porcentaje de al menos aproximadamente el 45 %, o al menos aproximadamente el 55 % o al menos aproximadamente el 65 % o al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 73 % de la composición total.
- 10 4. Un compuesto biomimético que comprende al menos dos dímeros de polipéptidos de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 15 5. El compuesto biomimético de la reivindicación 4 para su uso en un método de modulación de una respuesta inmunitaria o de tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto biomimético.
- 20 6. El compuesto biomimético para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la enfermedad inflamatoria es una enfermedad seleccionada entre artritis, esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, tiroiditis autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, polineuropatía inflamatoria crónica, esclerodermia, uveítis autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave y dermatitis atópica o una enfermedad asociada al trasplante de un órgano de un donante a un receptor; o una enfermedad infecciosa, una infección bacteriana o una infección vírica.
- 25 7. Un método para bloquear la unión no específica de anticuerpos en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* que comprende la incubación de un tejido diana o células diana con una composición que comprende una cantidad eficaz del compuesto biomimético de la reivindicación 4.
- 30 8. Un método para la producción de un compuesto biomimético que comprende la expresión de SEQ ID NO:4 en un huésped.
9. El método de la reivindicación 8 que comprende además:
 - (a) clonar un ADN que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:4 en un vector de expresión;
 - 35 (b) transfectar el vector de expresión en un huésped bacteriano;
 - (c) aislar el ADN de plásmido que contiene ADN clonado del cultivo bacteriano;
 - (d) linealizar el ADN de plásmido que contiene ADN clonado;
 - (e) transfectar el ADN linealizado en células de mamífero;
 - (f) expandir las células positivamente transfectadas para obtener una agrupación de células transfectadas de manera estable;
 - 40 (g) recoger el polipéptido del medio; y
 - (h) purificar el polipéptido, en donde el polipéptido no contiene secuencias extrañas.
- 45 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 en donde se escinde la secuencia líder.

Figura 1a

Estructura primaria de G045c



Estructura secundaria de G045c = homodímero de estradómero agrupado



Estructura cuaternaria de G045c = multímeros de estradómero agrupado

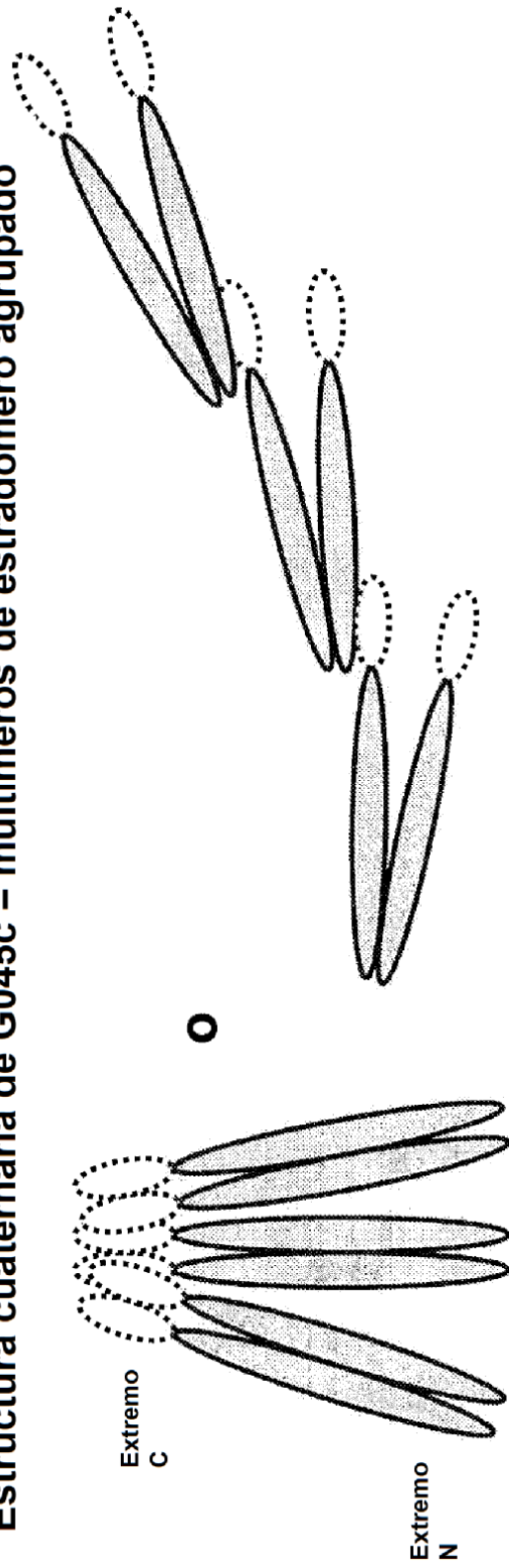


Figura 1b

Estructura primaria de G045antigua

○ = Dominio de multimerización
de bisagra de IgG2

● = Fc de IgG1

○ = sitio de restricción

**Estructura secundaria de G045antigua = homodímero de estradómero
agrupado**



Estructura cuaternaria de G045 = multímeros de estradómero agrupado

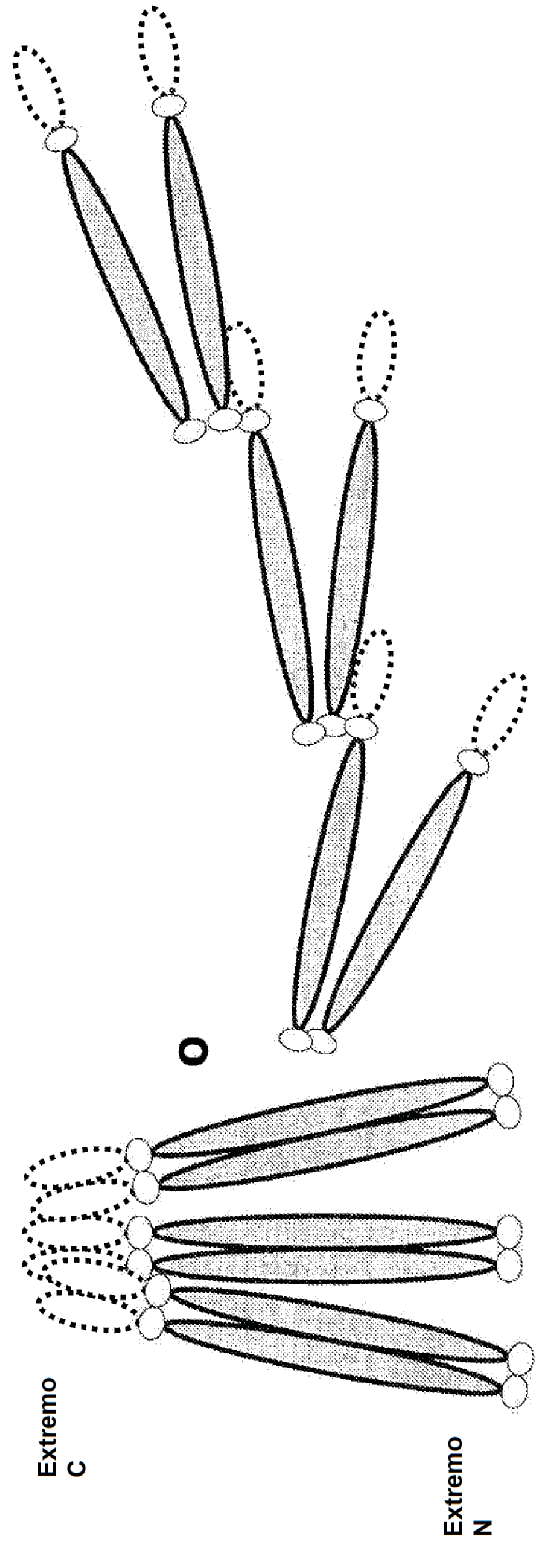
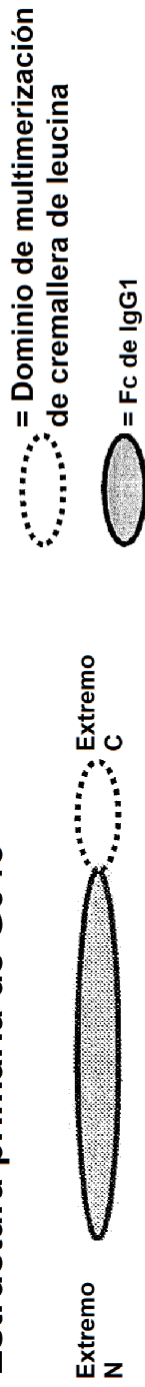


Figura 1c

Estructura primaria de G046



Estructura secundaria de G046 = homodímero de estradómero agrupado



Estructura cuaternaria de G046 = multímeros de estradómero agrupado

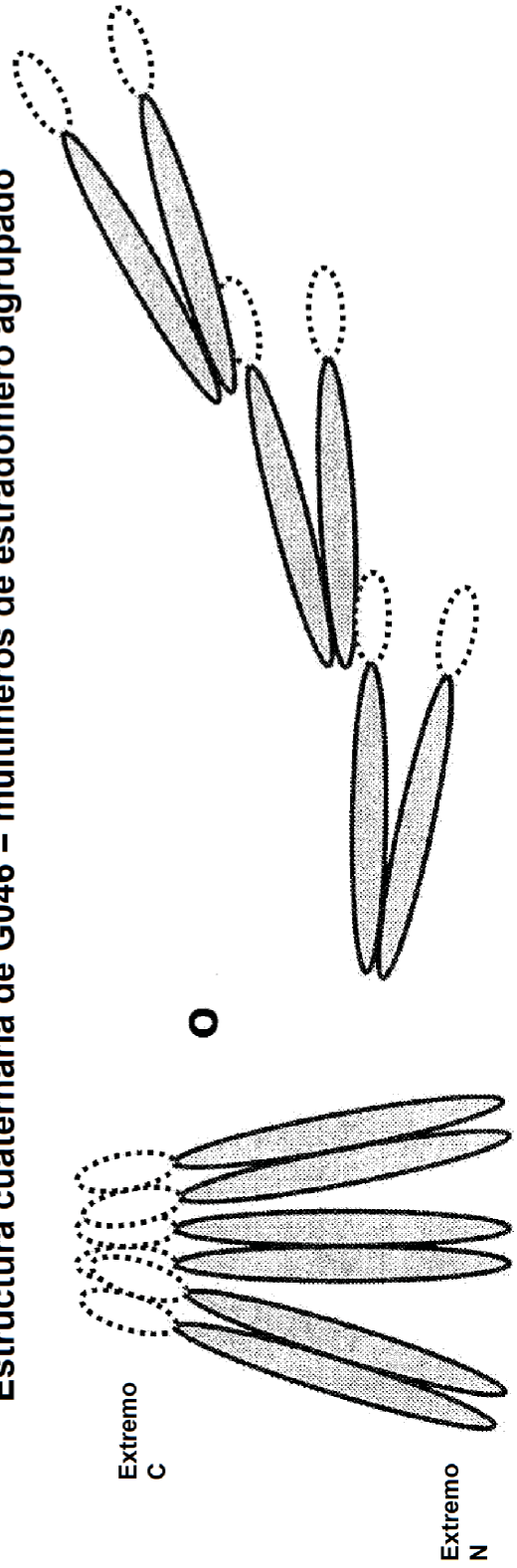
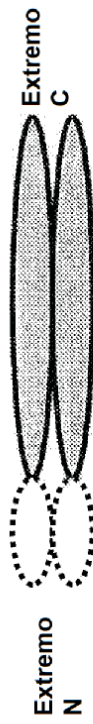


Figura 1d

Estructura primaria de G019



Estructura secundaria de G019 = homodímero de estradómero agrupado



Estructura cuaternaria de G019 = multímeros de estradómero agrupado

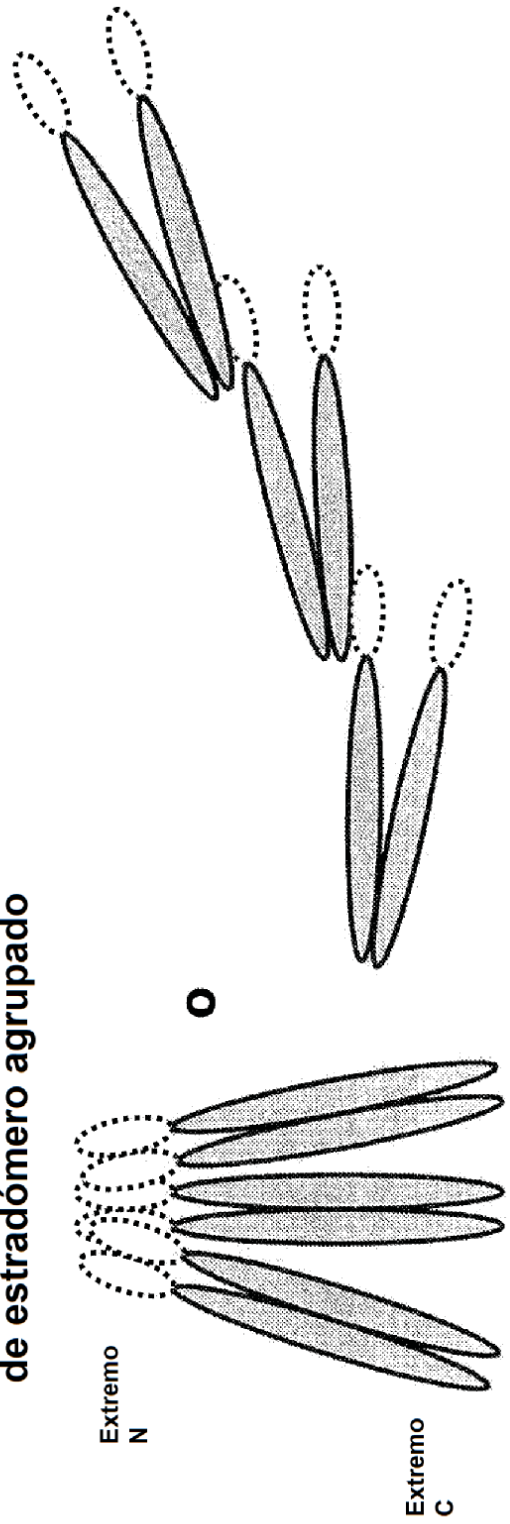


Figura 1e

Estructura primaria de G028



Estructura secundaria de G028 = homodímero de estradómero agrupado



Estructura cuaternaria de G028 = multímeros de estradómero agrupadoTM

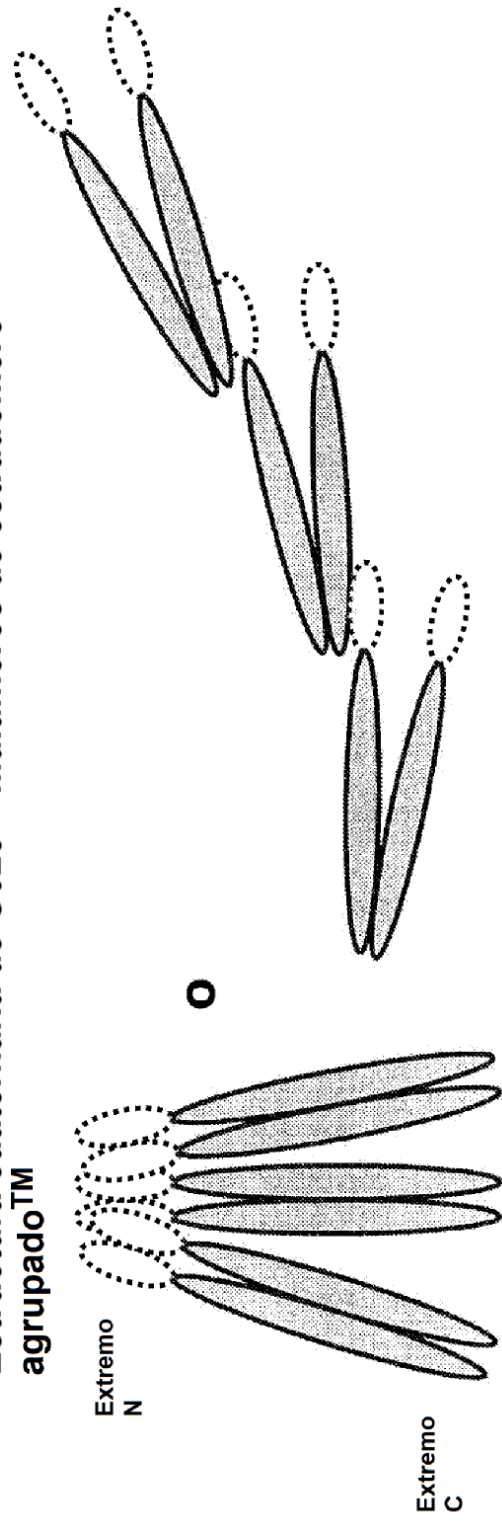


Figura 1f

Estructura primaria de G051



Estructura secundaria de G051 = homodímero de estradómero agrupado



Estructura cuaternaria de G051 = multímeros de estradómero agrupado

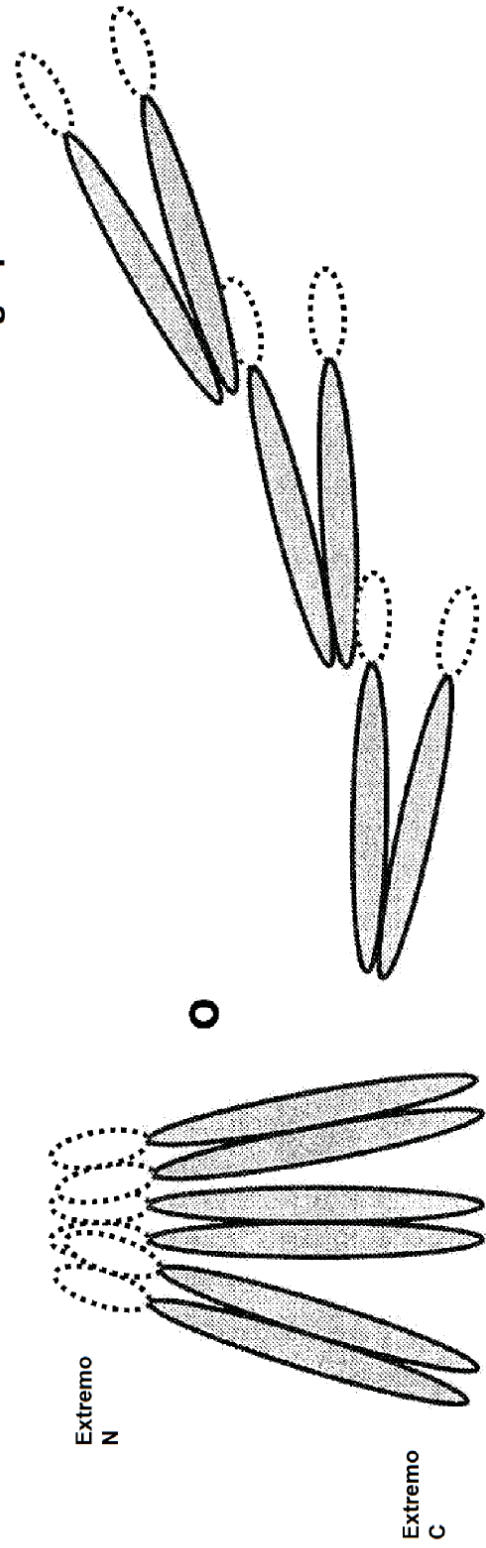
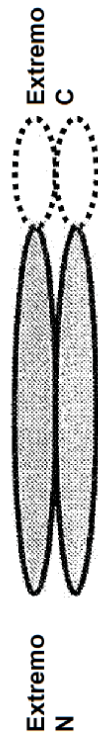


Figura 1g

Estructura primaria de G089



Estructura secundaria de G089 = homodímero de estradómero agrupado



Estructura cuaternaria de G089 = multímeros de estradómero agrupado

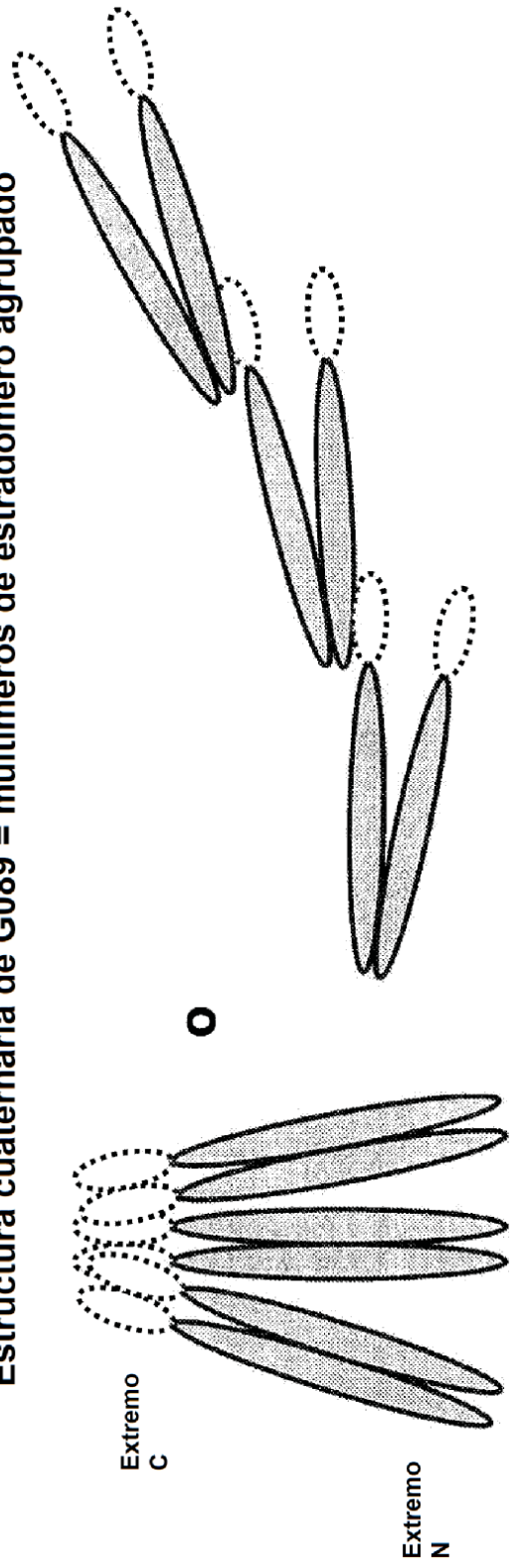


Figura 1h

Estructura primaria de G096



Estructura secundaria de G096 = homodímero de estradómero agrupado



Estructura cuaternaria de G096 = multímeros de estradómero agrupados

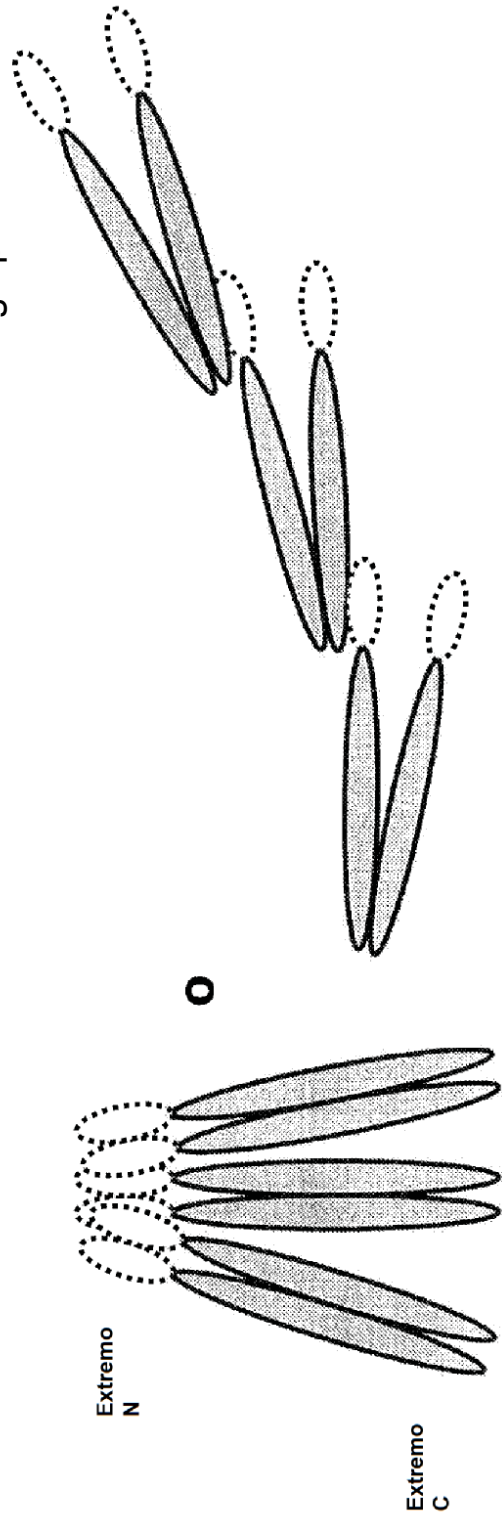


Figura 2:

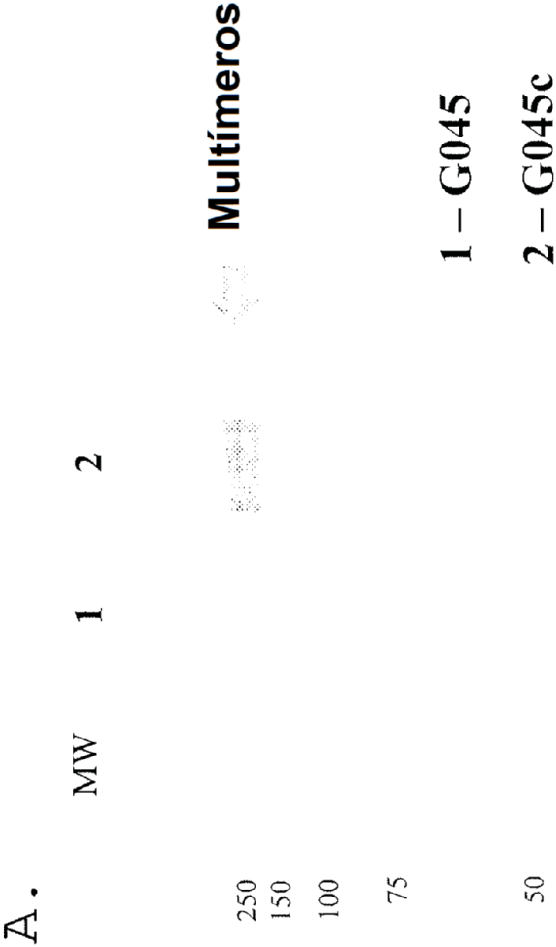
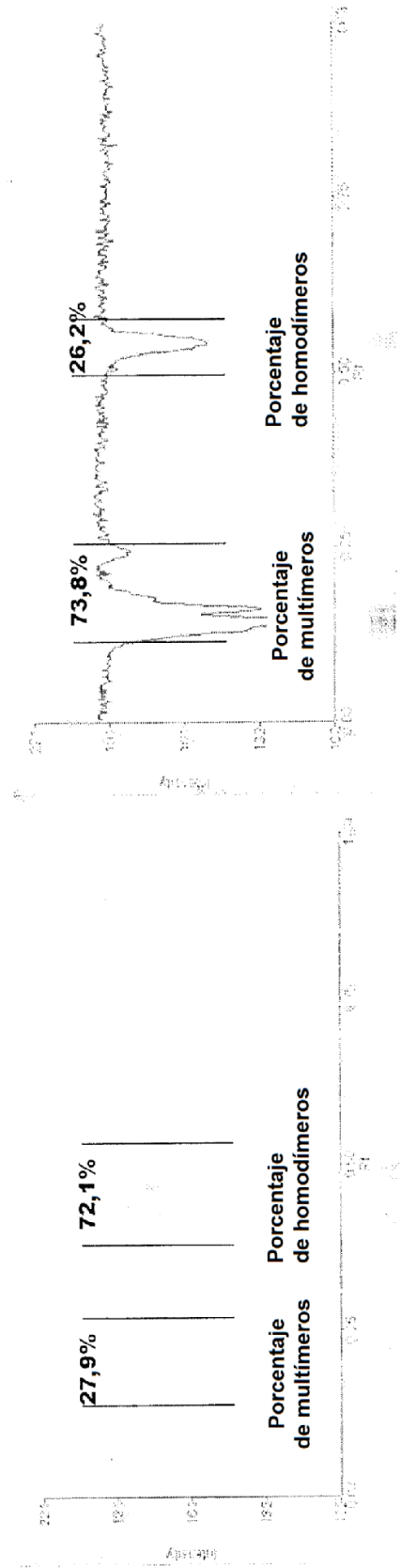


Figura 2b

Porcentaje de proteína total



G045antigua

G045c

Figura 3

Artritis inducida por colágeno

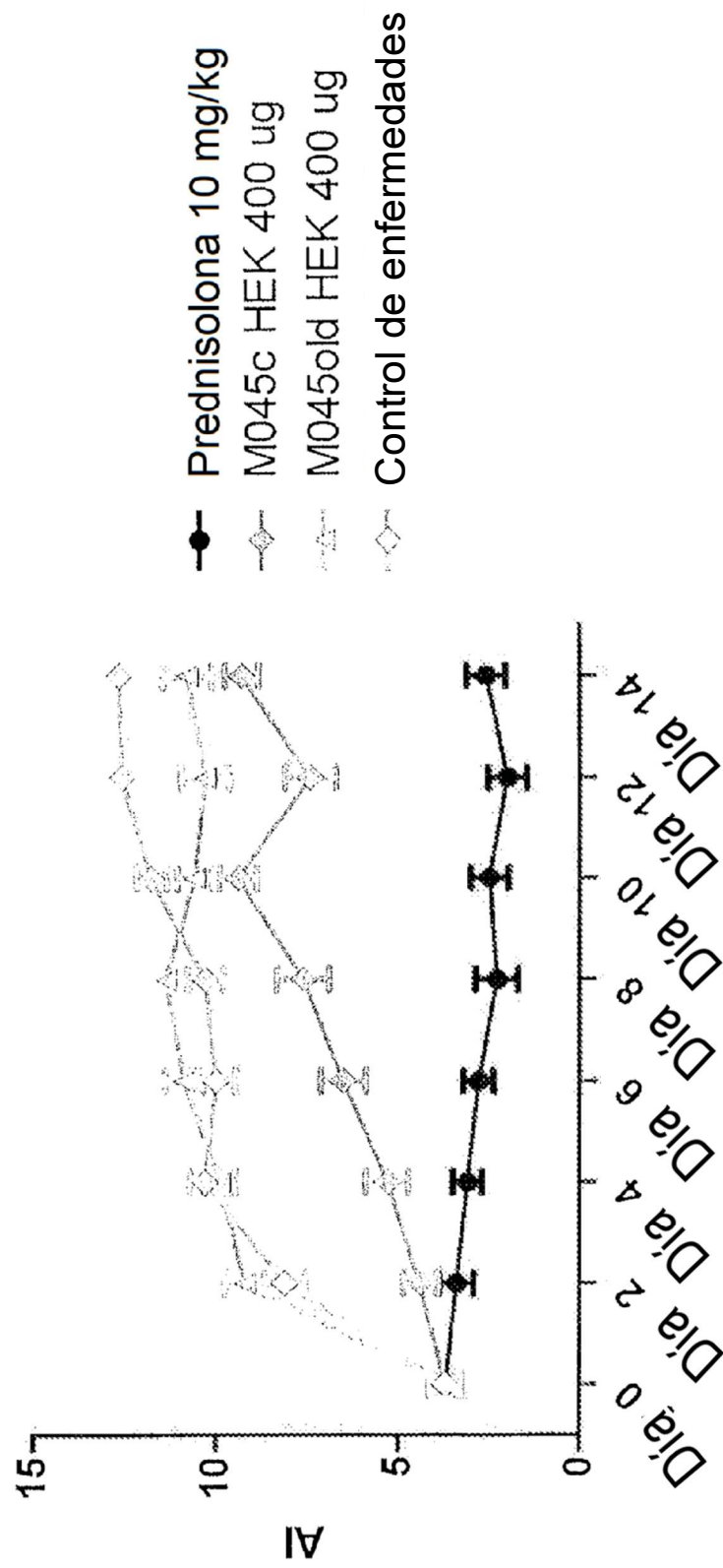


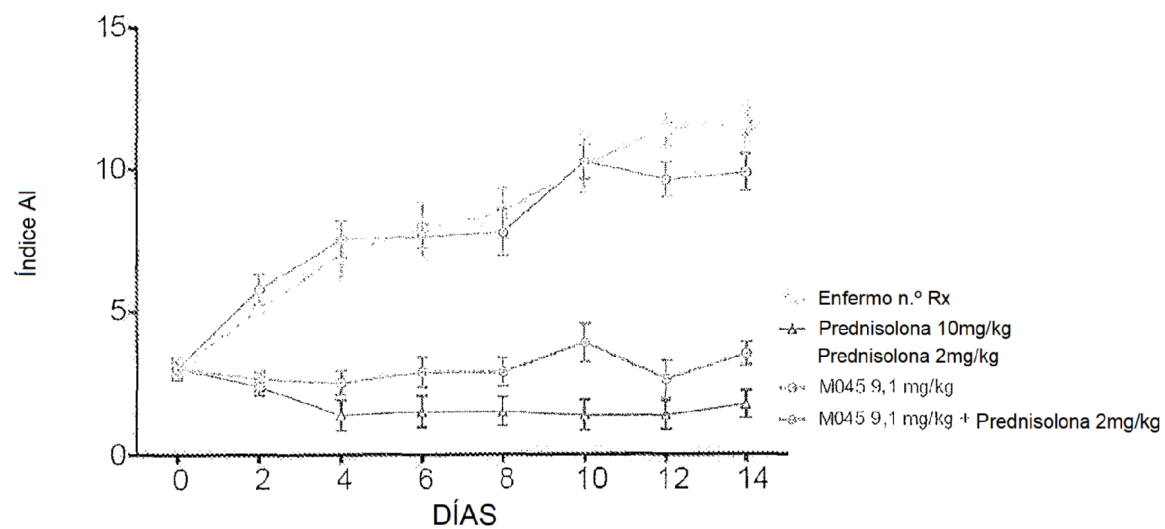
Figura 4

FIGURA 5

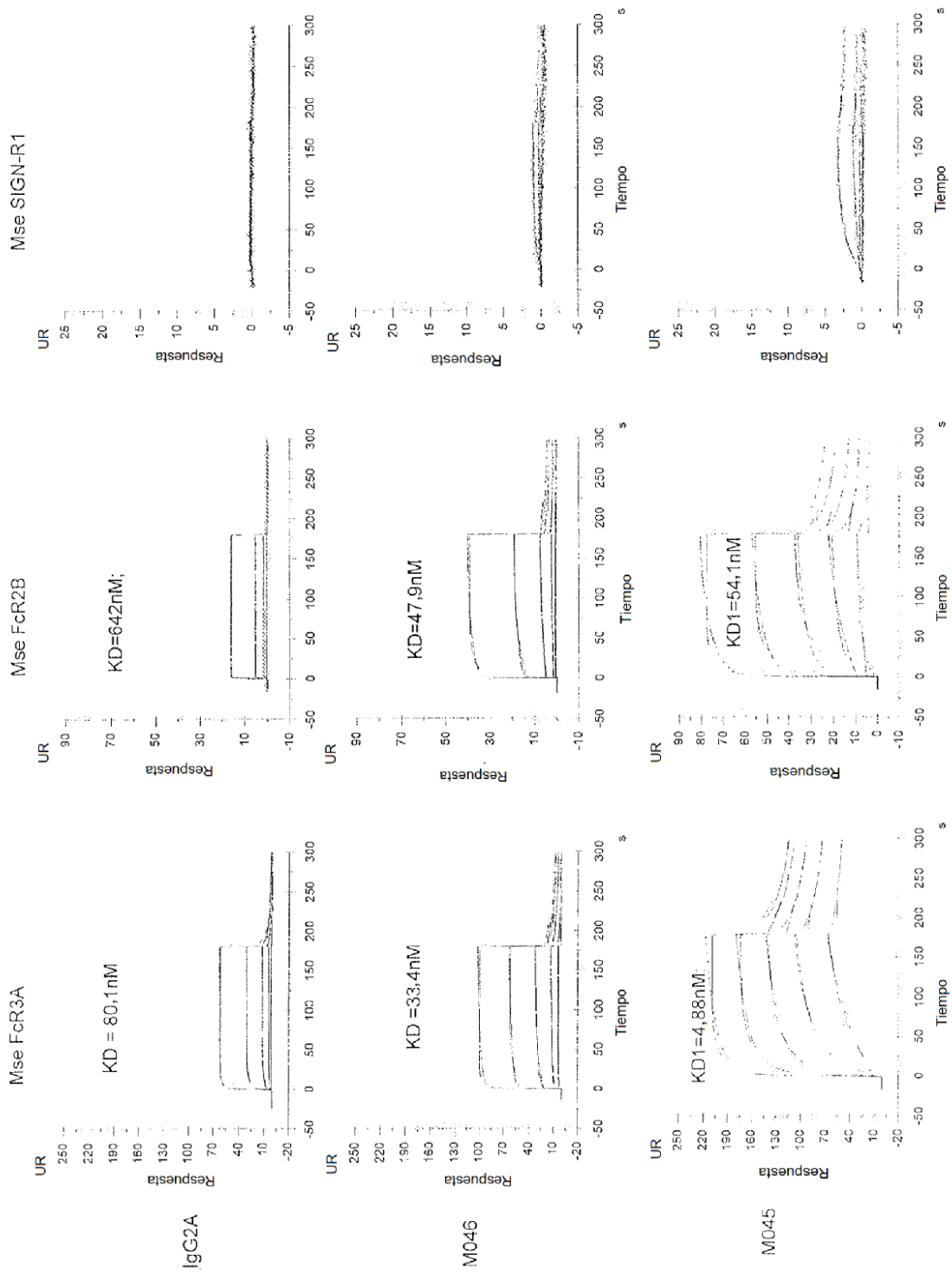


Figura 5, continuación

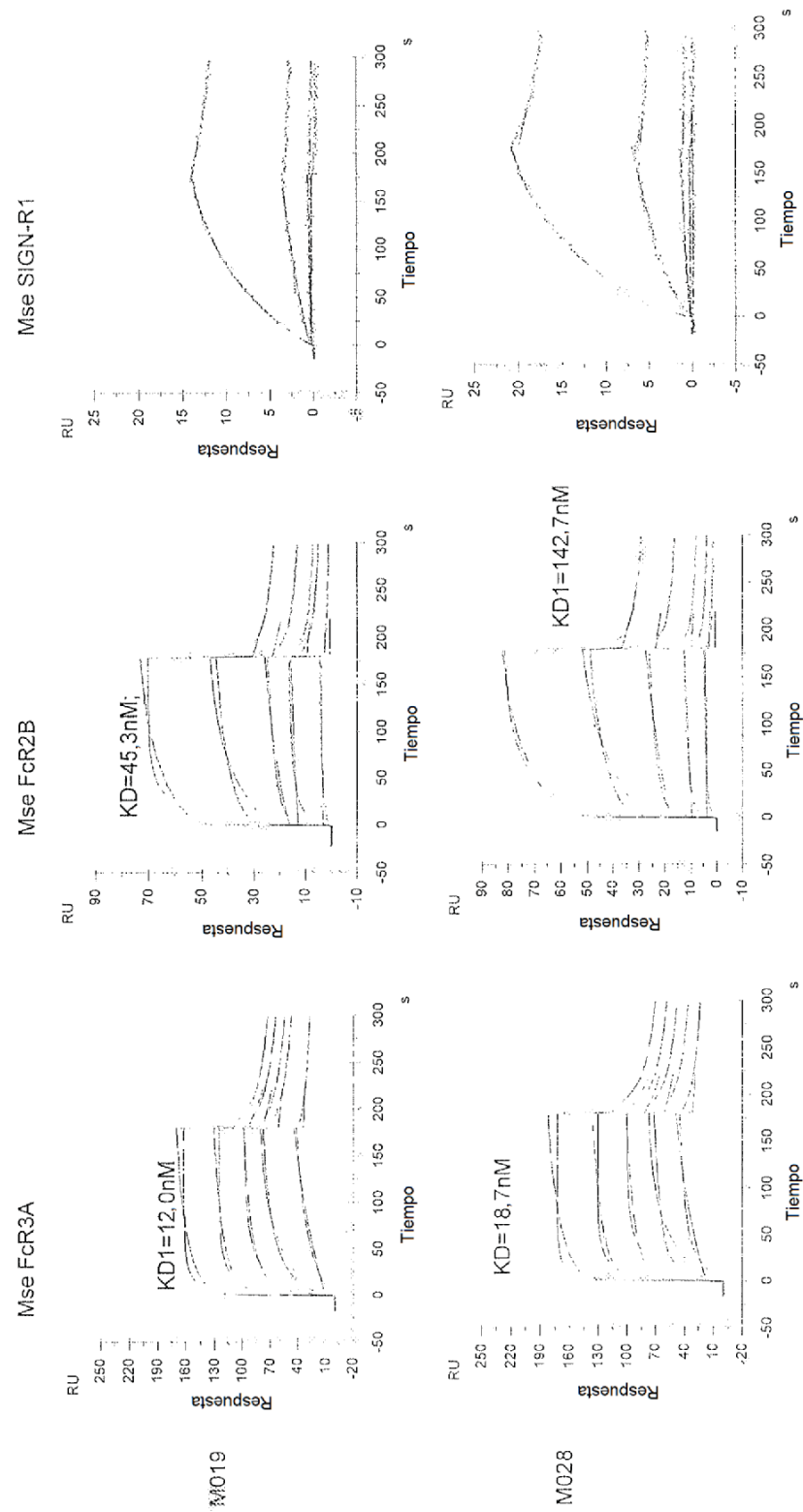


Figura 6a

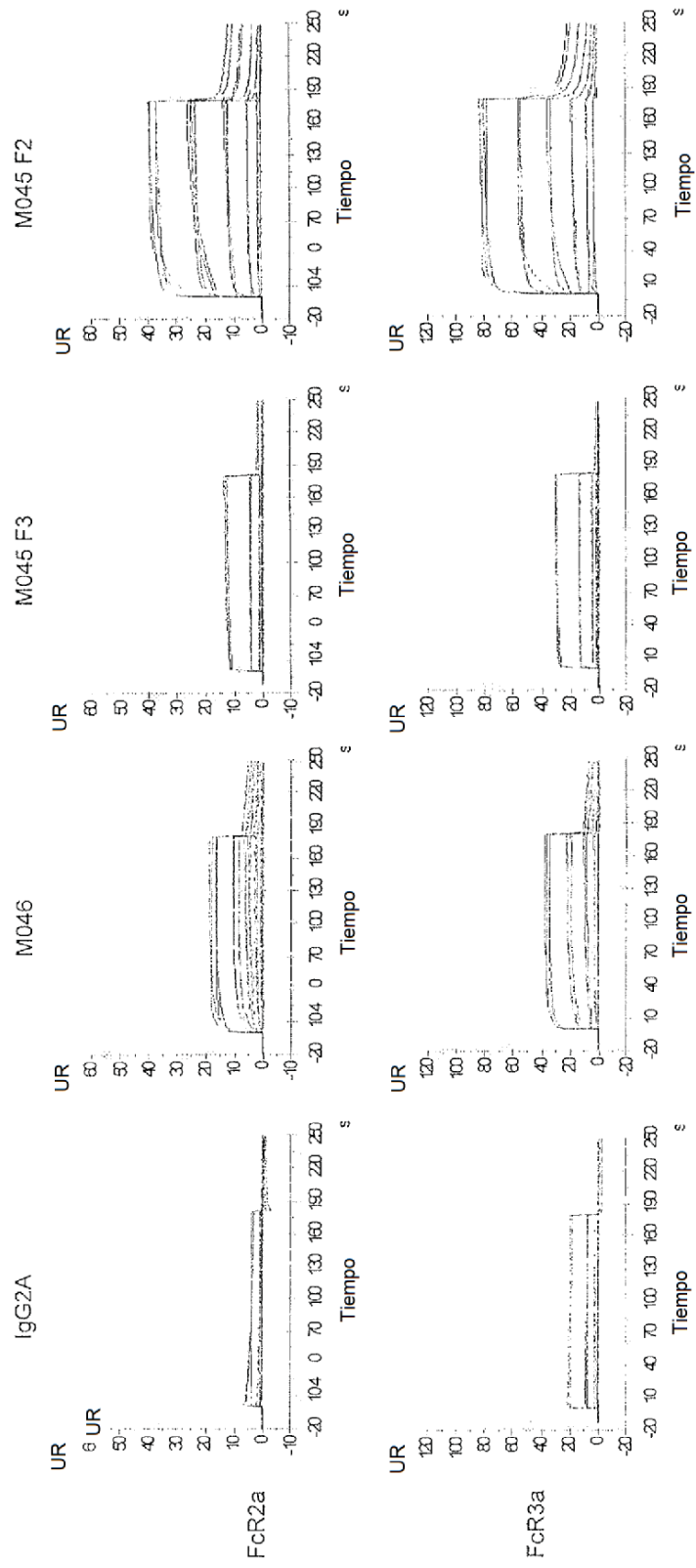


Figura 6a, continuación

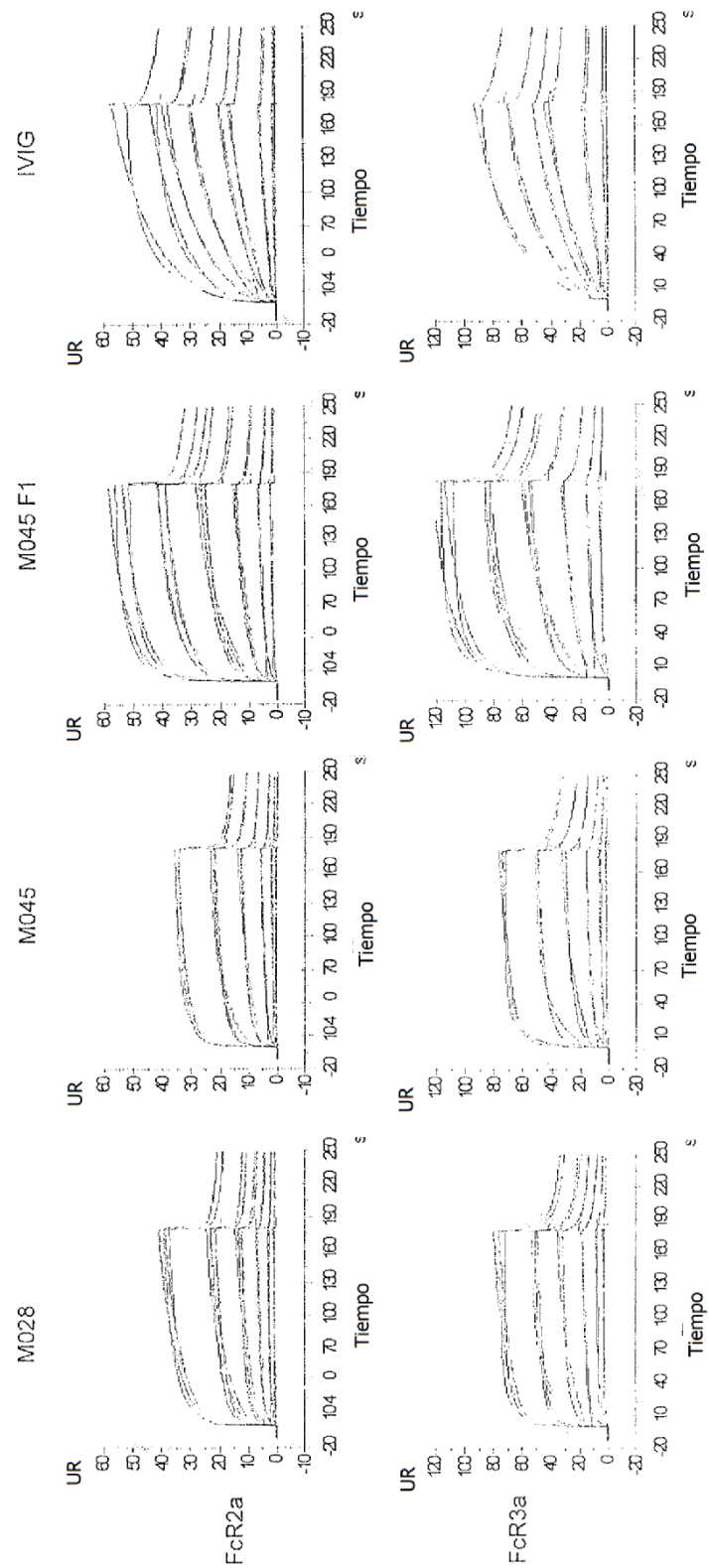


Figura 6b

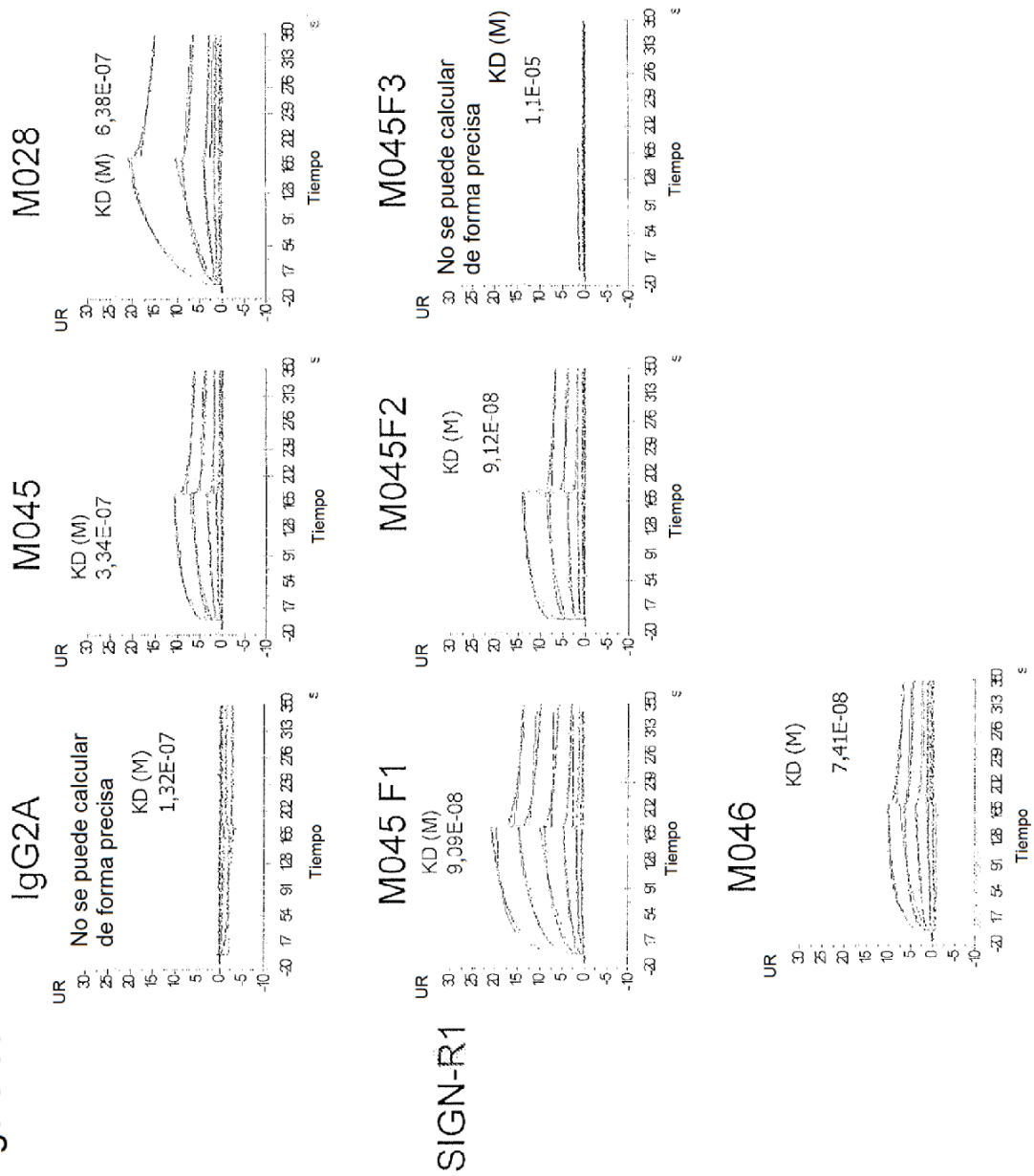


Figura 7

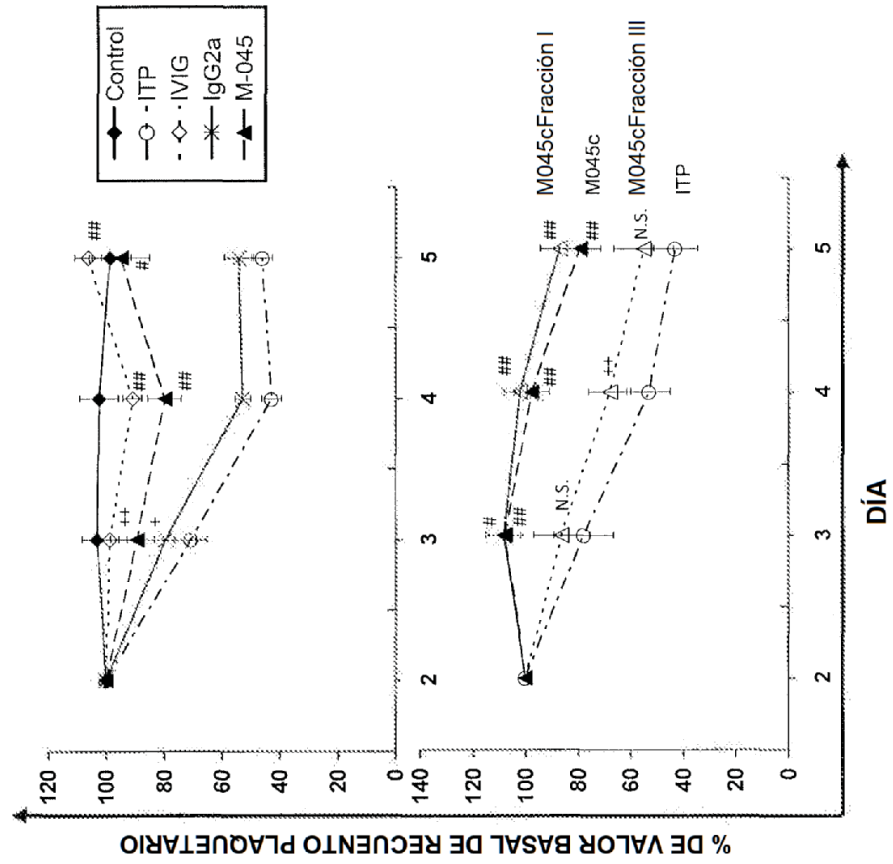


Figura 8

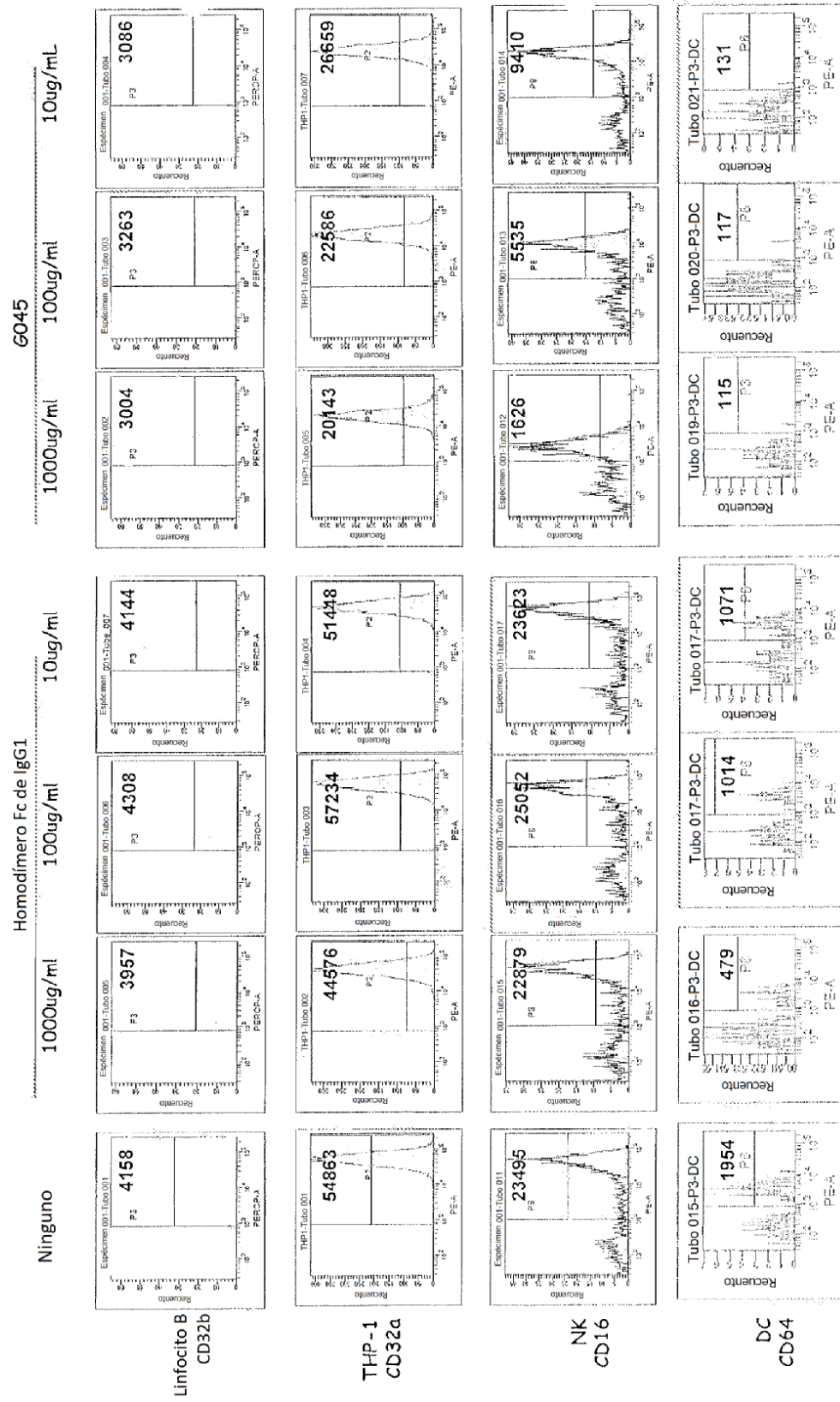


Figura 9

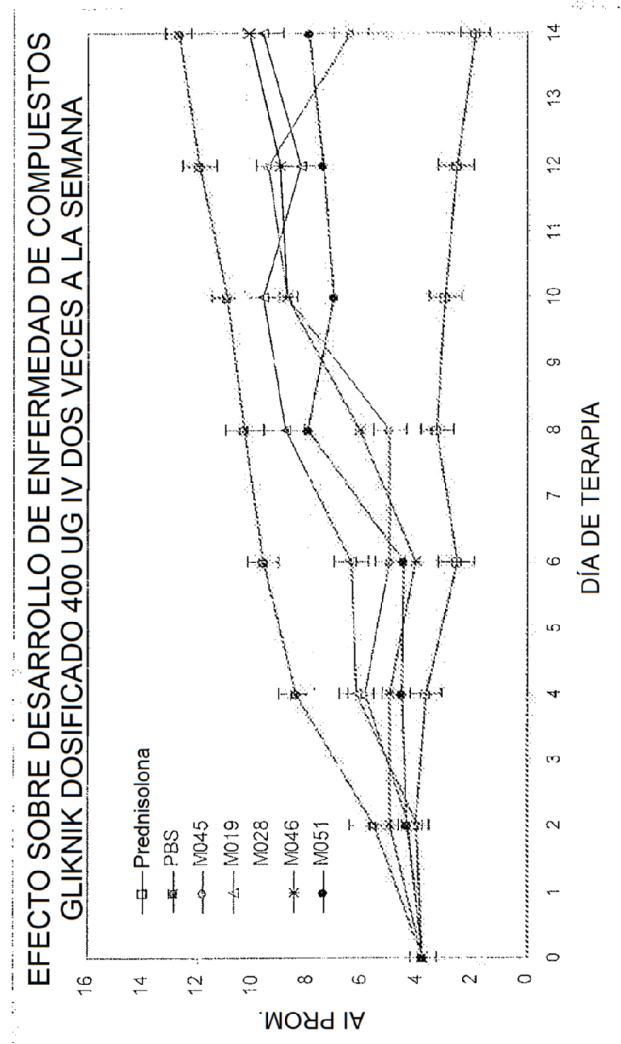


Figura 10

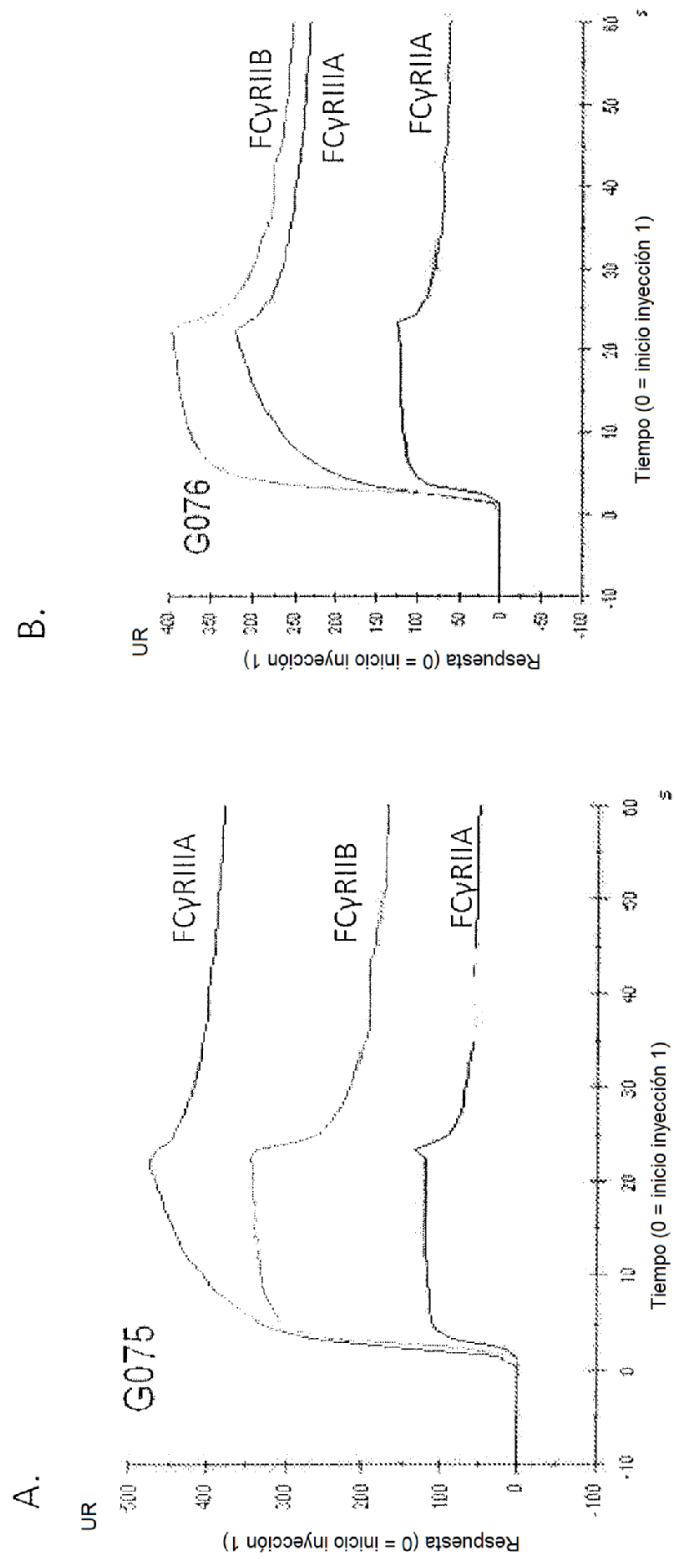


Figura 11

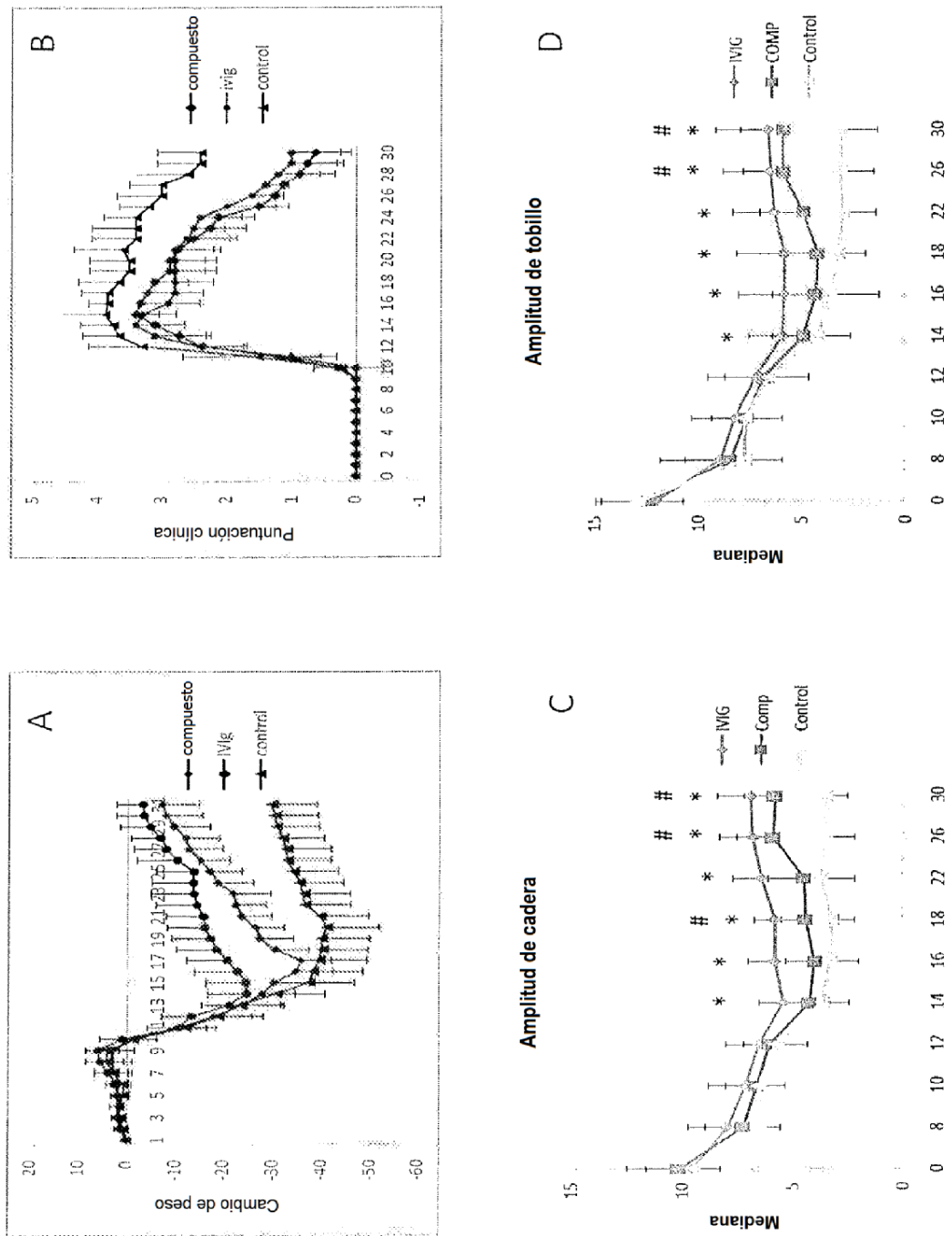


Figura 11, continuación

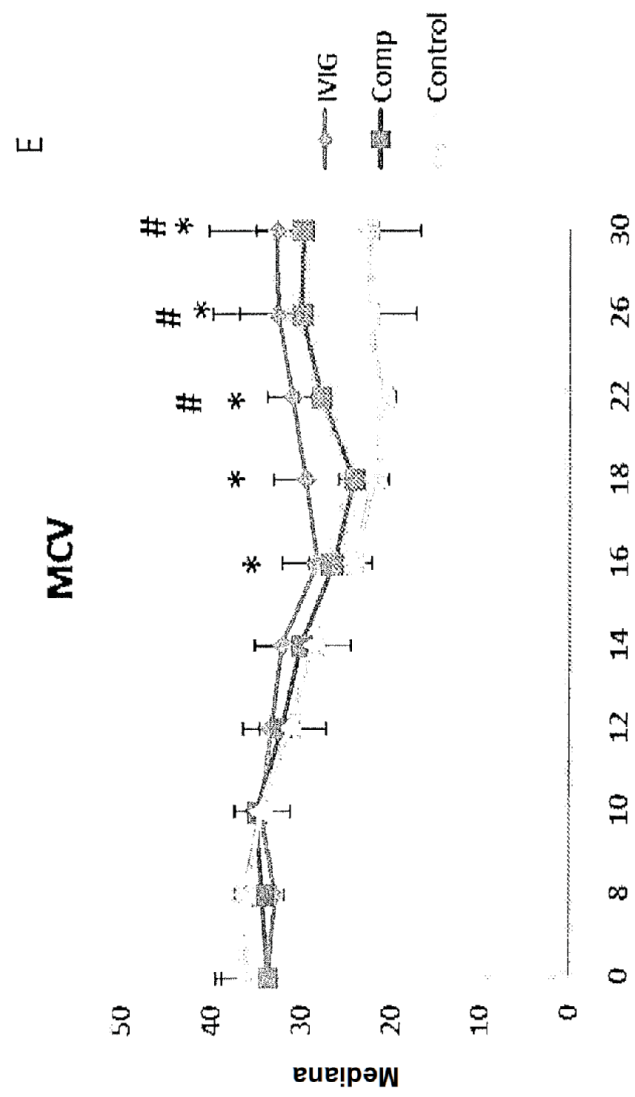


Figura 12

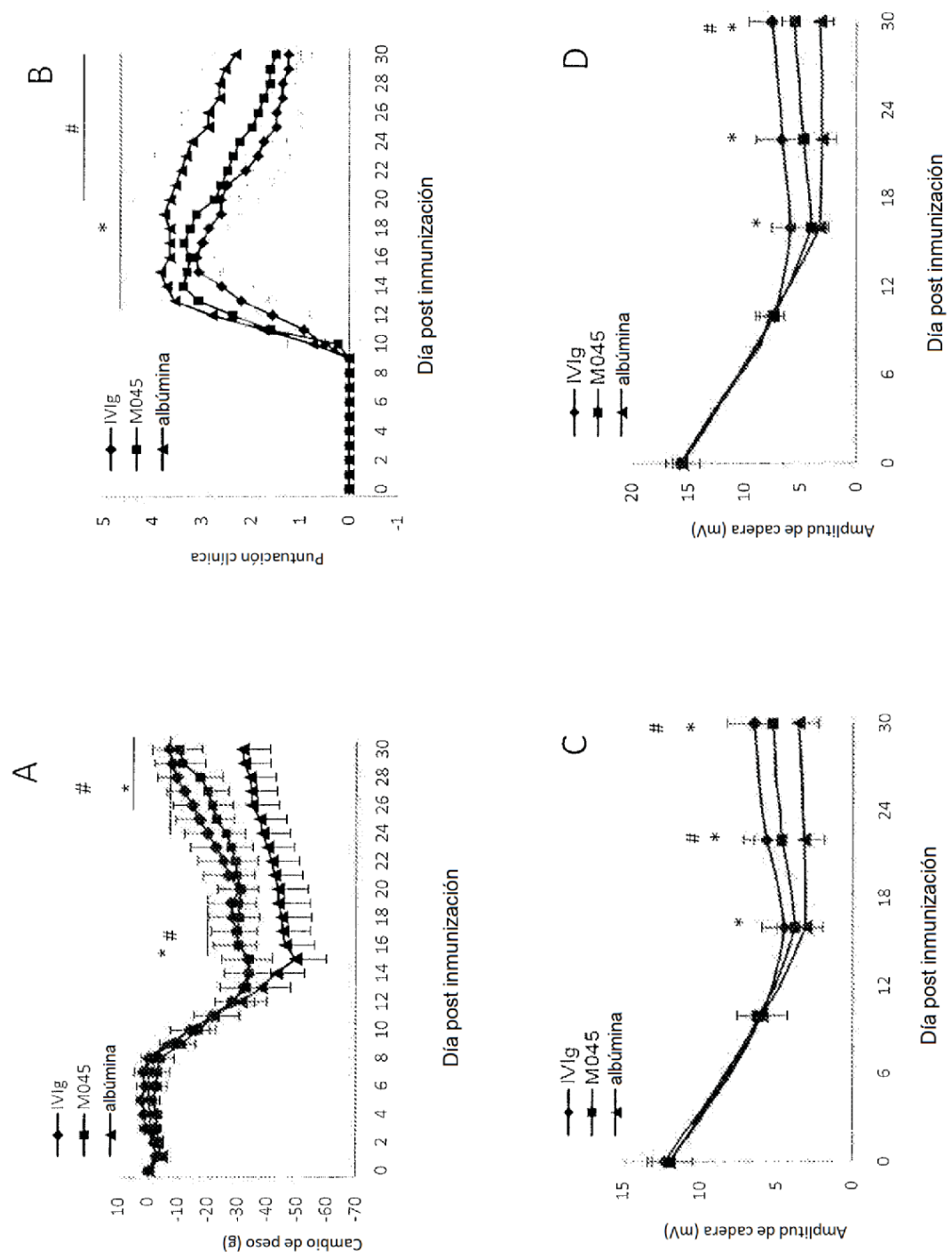


Figura 12 continuación

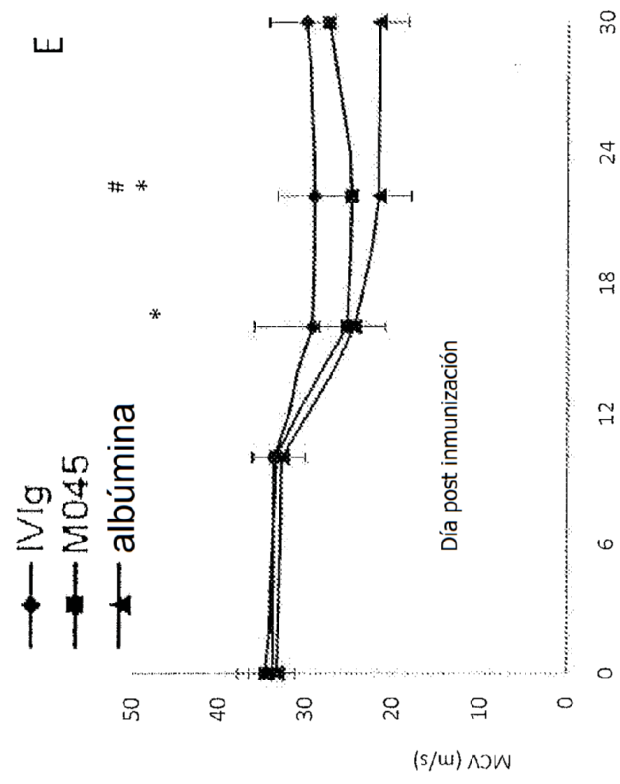


Figura 13

