

PROTEÍNAS DE FUSIÓN UTI

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a biología molecular, farmacología y medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El inhibidor de tripsina urinaria (Urinary Trypsin Inhibitor, UTI), también conocido como ulinastatina, uristatina, urinastatina, ulistina, inhibidor humano 30 (HI-30), mingina y bikunina, es un inhibidor de proteasa con un peso molecular de aproximadamente 40 kD. El UTI está presente en la orina y sangre humana (human urine and blood, hUTI) y presenta una variedad de actividades fisiológicas tales como un efecto inhibidor en una familia de la serina proteasas, tales como tripsina, α -quimotripsina, plasmina, catepsina-G y elastasa leucocitaria. El UTI también tiene un efecto inmunomodulador, y puede realizar una regulación descendente de la liberación de citocinas proinflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina (IL-6). Además, el UTI también interfiere con la vía de señalización mediada por dímeros activos PDGF-D (PDGF-DD)/PDGF-BBR al neutralizar el dímero.

hUTI ha recibido una autorización de comercialización y un producto se comercializa en Japón bajo la marca Miraclid y se aísla de la orina humana. De hecho, el hUTI aislado de la orina humana se comercializa actualmente por diversos fabricantes para el tratamiento de pancreatitis e insuficiencia circulatoria agua provocada por choque.

UTI se produce primero en seres humanos como una proteína precursora denominada AMBP (precursor de la α 1-microglobulina/bikunina), que se codifica en el cromosoma 9 humano. La proteólisis de AMBP produce la UTI libre con 143 aminoácidos. UTI comprende dos dominios Kunitz que son conocidos por inhibir las serina proteasas, que son flanqueadas por aminoácidos no estructurales en los extremos N y C terminales de UTI. Se espera que los dos dominios confieran diferente especificidades de la inhibición de proteasa, debido a los diferentes aminoácidos involucrados en la unión de proteasas. Por analogía a otros inhibidores

de serina proteasa (p. ej., BPTI, inhibidor de la tripsina pancreática bovina), podemos estimar que los dos aminoácidos clave para la inhibición de proteasa incluyen Met26 (dominio Kunitz 1) y Arg88 (dominio Kunitz 2). Poco se sabe sobre la implicación de las diferentes porciones de UTI durante la inhibición de diferentes proteasas, pero la remoción del dominio Kunitz 1 ha demostrado cambiar la especificidad de las proteasas, descubriendo nueva actividad inhibitoria contra el Factor Xa y la calicreína plasmática. El UTI de longitud completa no muestra inhibición de estas dos proteasas (Morishita et al., *Thrombosis Research* 1994, vol 73 (3/4) p193–204). UTI también comprende dos azúcares unidos, uno O–ligado en Ser10 y uno N–ligado en Asn45. La semivida de UTI en roedores y seres humanos es de 4 a 30 minutos (Fries et al, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2000, vol 32, p 125–137). La proteína de fusión UTI debería contener una secuencia optimizada de aminoácidos, que incluyen los mejores puntos de inicio y parada de cualquier dominio UTI, y pueden estar fusionados a otra proteína para mejorar las propiedades tales como la expresión, purificación, semivida y estabilidad. La secuencia exacta del compañero de fusión necesita una determinación y puede incluir variaciones en enlazadores, puntos de inicio/parada y/o mutaciones que pueden cambiar las propiedades funcionales del compañero de fusión.

Se conocen variantes de ulinastatina obtenidas a partir de la orina WO199856916, US5792629, US5407915, US5409895, US7019123, y US6583108. El concepto de proteínas de fusión de ulinastatina (y sus variaciones) se ha divulgado en US20080181892, US5541288, y US20080255025. Ciertas proteínas de fusión UTI se describen en CN 103044554A. Las proteínas de fusión de CN 103044554A hacen referencia a variantes específicas en el dominio Fc, presuntamente para evitar todo efecto farmacológico mediado por Fc (ADCC, CDC). Hemos descubierto sorprendentemente que un UTI–Fc con IgG1 tipo salvaje es bien tolerado y provee un incremento significativo en la semivida. También, comparadas con las proteínas de fusión UTI de CN 103044554A, las presentes proteínas de fusión UTI, en particular SEQ ID NO: 1 demuestran mayor estabilidad térmica.

La presente invención provee proteínas de fusión UTI, composiciones farmacéuticas, que comprenden las mismas, métodos de preparación y sus usos.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención provee proteínas de fusión UTI, que comprenden un dominio UTI y compañeros de fusión en donde el dominio UTI está operativamente

ligado al compañero de fusión. La presente invención provee proteínas de fusión UTI, que comprenden un dominio UTI y un dominio Fc en donde el dominio UTI está operativamente ligado al dominio Fc. La presente invención también provee proteínas de fusión UTI aisladas según se describe en la presente.

En algunas realizaciones, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, y 29. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:1. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:3. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:5. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:7. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:9. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:11. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:13. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:15. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:17. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:19. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:21. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:23. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:25. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:27. En una realización, la presente invención provee una proteína de fusión UTI que comprende SEQ ID NO:29.

Conforme con otra realización de la presente invención, la presente invención provee una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión UTI que comprenden las proteínas de fusión UTI descritas en la presente. Además, la invención provee las secuencias de ADN indicadas en SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, y 30. En una realización, el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión UTI además comprende un vector que contienen las secuencias de control a las cuales el ácido nucleico está operablemente unido. En

otra realización, la presente invención provee una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión UTI, tal como una célula de mamífero, insecto, E. coli o levadura, y que mantiene la célula huésped bajo condiciones en la que se expresa la molécula de la proteína de fusión.

En otra realización, la presente invención provee una composición farmacéutica que comprende las proteínas de fusión UTI descritas en la presente y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Conforme con una realización adicional de la presente invención, se provee un método para tratar trastornos relacionados con UTI, que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de una proteína de fusión UTI descrita en la presente.

Es decir, la presente invención provee el uso de una proteína de fusión UTI como un medicamento, incluso la elaboración de un medicamento, y el uso de una proteína de fusión UTI según se describe en la presente para el tratamiento de los trastornos relacionados con el UTI descritos en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 Estructura de dominio UTI y sitios de glicosilación.

FIG. 2 Dos constructos UTI-Fc que demuestran enlazadores alterados.

FIG. 3 Diversos constructos UTI-Fc de la presente invención.

FIG. 4 Estrategia de montaje de ADN (SLIC) utilizada en la construcción de la fusión de UTI.

FIG. 5 Supresión de la actividad de proteasa (tripsina) por UTI y UTI-Fc1, SEQ ID NO:1

FIG. 6 Supresión de la actividad de proteasa (quimotripsina) por UTI-Fc1, UFC1, SEQ ID NO:1.

FIG. 7 Supresión de la actividad de proteasa (proteasas múltiples) por UTI-Fc1, UFC1, SEQ ID NO:1.

FIG. 8 Supresión de la secreción de citocina (IL-6) UTI y UTI-Fc1, UTI-Fc, SEQ ID NO:1.

FIG. 9 Rendimientos de la purificación de las proteínas de fusión UTI.

FIG. 10 Efecto de SEQ ID NO:1 en C5a inducido por LPS en ratones C3H.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee proteínas de fusión UTI, un dominio UTI y compañeros de fusión en donde el dominio UTI está operativamente ligado al compañero de fusión. Las proteínas de fusión UTI de la presente invención tienen un efecto inhibitorio en las proteasas, que incluye tripsina.

En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un polipéptido Fc. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un polipéptido Fc humano. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un análogo del polipéptido Fc humano. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un fragmento del polipéptido Fc humano. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un polipéptido Fc de ratón. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un polipéptido Fc de rata.

En algunas realizaciones, el compañero de fusión es albúmina humana. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un análogo de albúmina humana. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es albúmina humana modificada. En algunas realizaciones, el compañero de fusión es un fragmento de albúmina humana.

En algunas realizaciones, el dominio UTI es UTI humano (hUTI). En algunas realizaciones, el dominio UTI es un análogo de hUTI. En algunas realizaciones, el dominio UTI es un fragmento de hUTI. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión UTI comprende un dominio hUTI de tipo salvaje.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión UTI comprende un dominio hUTI de tipo salvaje y un dominio Fc humano. En algunas realizaciones, la proteína de fusión UTI comprende un dominio hUTI de tipo salvaje, un dominio enlazador y un dominio Fc humano.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión UTI comprende un dominio UTI humano de tipo salvaje y una albúmina humana o su análogo o su fragmento. En algunas realizaciones, la proteína de fusión UTI comprende un dominio de hUTI de tipo salvaje, un dominio enlazador y una albúmina humana o su análogo o su fragmento.

En algunas realizaciones, el dominio Fc se une a un receptor de Fc en una célula humana. En algunas realizaciones, la semivida en suero de la molécula es significativamente mayor que la semivida del dominio UTI solo. En algunas realizaciones, la actividad inhibitoria de proteasa del dominio UTI de la molécula es la misma o mayor que el dominio UTI solo. En algunas realizaciones, la

administración de la molécula a un ratón disminuye las reacciones inflamatorias, que incluyen, pero no se limitan a, la disminución de la activación de las células inmunes o la disminución de la producción, secreción o actividad de las citocinas o quimiocinas.

Se entiende que el dominio UTI puede estar operativamente unido al compañero de fusión por un dominio enlazador.

La presente invención provee una proteína de fusión UTI, que comprende un dominio UTI fusionado a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consta de a) un dominio Fc, b) un análogo del dominio Fc y c) un fragmento del dominio Fc en donde el dominio UTI se fusiona al dominio Fc, su análogo, o su fragmento por un dominio enlazador. La presente invención provee una proteína de fusión UTI, que comprende un dominio de hUTI fusionado a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consta de a) un dominio Fc, b) un análogo del dominio Fc y c) un fragmento del dominio Fc en donde el dominio de hUTI se fusiona al dominio Fc, su análogo, o su fragmento por un dominio enlazador.

La proteína de fusión de la presente abarca proteínas que tienen formas monoméricas y multiméricas ya sea que se preparen por una asimilación de un anticuerpo intacto o se produzcan por otros medios.

Los términos "multímero" y "multimérico" hacen referencia a las proteínas en las que los dominios Fc o las moléculas que comprenden los dominios Fc tienen dos o más cadenas de polipéptidos asociadas en forma covalente, no covalente o que tienen tanto interacciones covalentes como no covalentes. El término multímero incluye el término dímero.

El término "dímero" hacen referencia a las proteínas en las que los dominios Fc o moléculas que comprenden los dominios Fc tienen dos cadenas de polipéptidos asociadas en forma covalente, no covalente o que tienen tanto interacciones covalentes como no covalentes. Es decir, el término "dímero" hace referencia a las proteínas de fusión UTI en las que dos dominios Fc se asocian covalentemente, no covalentemente o que tienen tanto interacciones covalentes como no covalentes. Más específicamente, el término "dímero" hace referencia a las proteínas de fusión UTI en las que dos dominios Fc se asocian covalentemente.

La presente invención provee una proteína de fusión UTI, que comprende un dominio UTI fusionado a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consta de a) albúmina, b) análogos de albúminas, c) fragmentos de albúminas. La presente

invención también provee una proteína de fusión UTI, que comprende un dominio hUTI que se fusiona a un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consta de a) una albúmina humana, b) análogos de albúmina, c) fragmentos de albúmina humana en donde la hUTI se fusiona a la albúmina, su análogo o su fragmento mediante un dominio enlazador.

DEFINICIONES DE LOS TÉRMINOS

Los términos usados en esta memoria descriptiva y reivindicaciones se definen según se establece a continuación a menos que se indique lo contrario.

Como se utiliza en la presente, los términos "enlazado", "fusionado" o "fusión" se usan de manera intercambiable.

Estos términos hacen referencia a la unión de dos o más elementos o componentes o dominios, por cualquier medio que incluya conjugación química o un medio recombinante. Los métodos de conjugación química se conocen en la técnica.

Una "proteína de fusión" hace referencia a un polipéptido que tiene dos o más porciones covalentemente unidas, donde una o más porciones derivan de proteínas diferentes. Las dos porciones pueden unirse directamente por un único enlace de péptidos (p. ej., las porciones enlazadas directamente una con otra) o a través de un enlazador peptídico que contiene uno o más residuos de aminoácidos (p. ej. con un aminoácido interviniente o secuencia de aminoácidos entre las porciones). Por lo general, el ADN que codifica las dos porciones y el enlazador estará en el marco de lectura respecto al otro y se producen con técnicas recombinantes.

Un "dominio UTI" es una proteína o péptido que imita la actividad de UTI. Se entiende que el dominio UTI de la presente invención puede alterarse de manera que varíen las secuencias de las secuencias de origen natural o nativo de las cuales derivan, mientras conservan la actividad deseada de la secuencia nativa. Preferentemente el dominio UTI es un UTI humano nativo (hUTI), sus análogos o variantes. Las variantes de hUTI incluyen el reemplazo o la modificación de uno o más aminoácidos de hUTI nativo que no son una característica estructural requerida o proveen actividad funcional, incluso sustituciones conservadoras. Las variantes de hUTI incluyen la eliminación o la inserción de uno o más aminoácidos de hUTI nativo que no son una característica estructural requerida o proveen actividad funcional. Las variantes de hUTI incluyen el reemplazo o la modificación de uno o

más aminoácidos del hUTI nativo para modificar una o más propiedades o actividades. Las variantes de hUTI incluyen la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos del hUTI nativo para modificar una o más propiedades o actividades de UTI. Las variantes de hUTI incluyen la eliminación o la alteración de los sitios de glicosilación en el UTI humano nativo. Las variantes de hUTI incluyen la eliminación o alteración de uno o más dominios Kunitz. Las variantes de hUTI pueden introducirse por técnicas estándar, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR.

La secuencia de residuos de aminoácidos del dominio hUTI recombinante se establece como SEQ ID NO: 31. Por lo general, el dominio UTI incluye una secuencia al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica al dominio hUTI recombinante que se indica como SEQ ID NO:31.

Un "dominio Fc" es el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que no incluye el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte o toda la bisagra. Así, un dominio Fc hace referencia a la porción de unión no a antígeno de un anticuerpo, ya sea en la forma monomérica o multimérica. El anticuerpo del cual surge el dominio Fc tiene preferentemente origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, si bien se prefieren IgG1 e IgG2.

Un dominio Fc incluye la región bisagra de la cadena pesada. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" o "región bisagra de inmunoglobulina" en la presente se hace referencia al polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y el segundo dominio constante de un anticuerpo, tan solo aguas arriba del sitio de escisión de papaya. Por consiguiente, para IgG, un dominio Fc comprende dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 y la región bisagra entre CH1 y CH2. Si bien los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada IgG humana se definen por lo general para incluir residuos C226 o P230 a su extremo terminal carboxilo, en donde la numeración se realiza conforme con el índice EU y en Kabat. En algunas realizaciones, como se describirá más completamente a continuación, las modificaciones de aminoácidos se realizan al dominio Fc, por ejemplo para alterar la unión a uno o más receptores FcγR o al receptor FcRn.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el término dominio Fc incluye la región bisagra que puede truncarse, modificarse por reemplazo, delección y/o inserción y además la región bisagra modificada o no modificada puede ser el sitio de unión de un dominio enlazador.

Un "análogo de un dominio Fc" hace referencia a una molécula o secuencia que está modificada de su Fc nativo pero que todavía comprende un sitio de unión para el receptor de reciclaje. El término análogo de un dominio Fc incluye una molécula o secuencia que está humanizada a partir de un Fc nativo no humano. El término análogo de un dominio Fc también incluye una molécula o secuencia que carece, o tiene modificaciones de, uno o más residuos Fc nativos que afecta o se ven implicados en la formación de disulfuro, incompatibilidad con una célula huésped, heterogenicidad en el extremo N terminal tras la expresión, estabilidad, glicosilación, interacción con un complemento, unión a un receptor de reciclaje de Fc y/o interacción con un receptor Fcγ.

Los términos "fragmentos del dominio Fc" o "fragmento del dominio Fc" hacen referencia a un Fc nativo del cual se han eliminado uno o más sitios donde los sitios removidos no constituyen las características estructurales ni la actividad funcional que se requieren por las proteínas de fusión de la presente invención. Los fragmentos del dominio Fc incluyen borrar residuos del Fc nativo o truncar el Fc nativo y puede incluir sustituciones de los residuos restantes. Los residuos insertados o alterados (p. ej., los residuos sustituidos) pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos alterados, peptidomiméticos, aminoácidos no naturales o aminoácidos D.

Por lo general, el dominio Fc incluye una secuencia al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM, en particular una IgG1 o IgG2 humana.

El término dominio Fc abarca Fc nativo y análogos de Fc e incluye formas monoméricas y multiméricas ya sea que se preparen mediante una asimilación de un anticuerpo intacto o se produzcan por otros medios.

En ciertas realizaciones, un dominio Fc comprende al menos un dominio bisagra (región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2 (o una variante o fragmento del mismo), y un dominio CH3 (o una variante o fragmento del mismo). En otra realización, un dominio Fc consta de un dominio bisagra (región bisagra

superior, media y/o inferior), un dominio CH2 (o una variante o fragmento del mismo), y un dominio CH3 (o una variante o fragmento del mismo). En ciertas otras realizaciones, un dominio Fc consta de un dominio bisagra (región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2 (o una variante o fragmento del mismo), un dominio CH3 (o una variante o fragmento del mismo) y un dominio CH4 (o una variante o fragmento del mismo). En otra realización, un dominio Fc consta de un dominio bisagra (región bisagra superior, media y/o inferior) y un dominio CH2. En otra realización, un dominio Fc consta de un dominio bisagra (región bisagra superior, media y/o inferior) y un dominio CH3 (o una variante o fragmento del mismo). En otra realización, un dominio Fc consta de un dominio CH2 (o una variante o fragmento del mismo), y un dominio CH3 (o una variante o fragmento del mismo). En otra realización, el dominio Fc consta de un dominio CH2 completo y un dominio CH3 completo. En otra realización, el dominio Fc consta de un dominio CH2 completo y un dominio CH3 completo. En una realización, un dominio Fc de la invención comprende al menos la porción de la molécula Fc conocida en la técnica como necesaria para la unión FcRn. En otra realización, un dominio Fc de la invención comprende al menos la porción de la molécula Fc conocida en la técnica como necesaria para la unión de la Proteína A. En otra realización, un dominio Fc de la invención comprende al menos la porción de la molécula Fc conocida en la técnica como necesaria para la unión de la Proteína G.

Conforme con la presente invención, un dominio Fc por lo general hace referencia a un polipéptido que comprende todo o parte del dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Como se trató anteriormente, esto incluye, pero no se limita a polipéptidos que comprenden toda la región bisagra, los dominios CH1, CH2, y/o CH3 como también los fragmentos de dichos péptidos que comprenden, por ejemplo, la bisagra, los dominios CH2 y CH3. El dominio Fc puede derivarse de toda inmunoglobulina de cualquier especie y/o subtipo, incluso pero sin limitarse a un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM humana. Un dominio Fc incluye los últimos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgD, los tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM y el extremo N terminal de bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J.

Un dominio Fc como se usa en la presente abarca moléculas de Fc nativo y variantes de Fc. Como con las variantes de Fc y las proteínas de Fc nativo, el

término dominio Fc incluye moléculas en la forma monomérica y multimérica, en caso que se asimile a partir de un anticuerpo o se produzca por otro medio.

Como se indica en la presente se entiende, que todo dominio Fc puede modificarse de manera que varíe en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc nativo de la molécula de inmunoglobulina de origen natural. En ciertas realizaciones ejemplares, el dominio Fc conserva una función efectora, por ejemplo, unión a FcγR. En ciertas realizaciones ejemplares, el dominio Fc carece de una función efectora, por ejemplo, unión a FcγR.

El dominio Fc de la invención puede derivar de moléculas de inmunoglobulina diferentes. Por ejemplo, un dominio Fc puede comprender un dominio CH2 y/o CH3 que deriva de una IgG1 y región bisagra derivada de IgG3.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión UTI incluyen un dominio Fc. Los dominios Fc útiles para producir las proteínas de fusión UTI de la presente invención pueden obtenerse a partir de una cantidad de fuentes diferentes. En realizaciones preferidas, un dominio Fc de las proteínas de fusión UTI deriva de una inmunoglobulina humana. Se entiende, sin embargo, que el dominio Fc puede derivarse de una inmunoglobulina de otra especie de mamíferos, que incluye por ejemplo, especies de roedores (p. ej., un ratón, rata, conejo, cobayo) o primates no humanos (p. ej. chimpancé, macaco). Además, el dominio Fc de las proteínas de fusión UTI o su porción puede derivarse de toda clase de inmunoglobulina.

Los términos "tipo salvaje" o "wt" o "nativo" como se utilizan en la presente hacen referencia a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluso las variaciones alélicas. Una proteína de tipo salvaje, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, polinucleótido, ADN, ARN y similar tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionalmente.

En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión UTI de la presente invención pueden emplear un dominio enlazador. El dominio enlazador se usa para operacionalmente conectar un dominio UTI a un compañero de fusión.

El término "dominio enlazador" hace referencia a enlazadores de polipéptidos, enlazadores no peptídicos y sus combinaciones. En particular, un dominio enlazador puede ser un polipéptido. Como se utiliza en la presente, el término "dominio enlazador" hace referencia a una secuencia que conecta dos dominios en una secuencia lineal. Tal como se utiliza en la presente, el término "enlazador de

polipéptido" hace referencia a una secuencia de péptidos o polipéptidos (p. ej., una secuencia de péptidos o polipéptidos sintética) que conecta dos dominio en una secuencia de aminoácidos lineal de una cadena de polipéptidos. Por ejemplo, los enlazadores de polipéptidos pueden usarse para conectar un dominio UTI a un dominio Fc. Preferentemente, dichos enlazadores de polipéptidos pueden proveer flexibilidad a la molécula de polipéptidos. Una proteína de fusión UTI de la invención puede comprender un dominio enlazador, que incluye un enlazador peptídico.

Por ejemplo, un dominio enlazador puede usarse para conectar dos dominios en una secuencia de aminoácidos lineal de un enlazador polipeptídico, tal como la unión a un dominio UTI con un dominio Fc. En ciertas realizaciones, un dominio enlazador puede usarse para conectar un dominio UTI a un dominio de FC. El dominio enlazador puede usarse para conectar los dominios en cualquier orden, Por ejemplo, en algunas realizaciones un enlazador conectará un dominio UTI y un dominio Fc con el orden UTI–enlazador–Fc, mientras que en otras realizaciones un enlazador conectará un dominio UTI y un dominio Fc con el orden Fc–enlazador–UTI, mientras que las regiones de polipéptidos se indican desde el extremo N terminal al extremo C terminal. Enlazadores polipeptídicos ejemplares incluyen aquellos que constan de residuos de glicina y serina, los bien denominados enlazadores polipeptídicos Gly–Ser. Como se utiliza en la presente, el término "enlazador polipeptídico Gly–Ser" hace referencia a un péptido que consta de residuos de glicina y serina. Un enlazador polipeptídico Gly–Ser ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos $\text{Ser}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ en donde n es un número entero 1 a 10, SEQ ID NO:33–42, respectivamente. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=1$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=2$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=3$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=4$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=5$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=6$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=7$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlazadores polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=8$. En

una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlaces polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=9$. En una realización, la proteína de fusión UTI incluye uno o dos enlaces polipeptídicos Gly–Ser en donde $n=10$.

Otro enlazador ejemplar se da en SEQ ID NO:43.

El término "que comprende" hace referencia a que un compuesto, es decir, proteína de fusión, puede incluir aminoácidos adicionales en ambos extremos N o C terminales. Por supuesto, estos aminoácidos adicionales no deberían interferir en forma significativa con la actividad del compuesto, es decir, la proteína de fusión.

El término "aminoácido" hace referencia a aminoácidos de origen natural o sintético como también a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, como también aquellos aminoácidos codificados que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina y fosfoserina. Los análogos de aminoácidos hacen referencia a un compuesto, es decir, proteínas de fusión que tienen la misma estructura química básica que los aminoácidos de origen natural, es decir, un átomo de carbono unido a un átomo de hidrógeno, grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Los análogos de aminoácidos tienen grupos R modificados, o dan lugar a estructuras de polipéptidos modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que los aminoácidos de origen natural.

El término "sustitución de aminoácidos" hace referencia al reemplazo de al menos un residuo de aminoácidos existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada o nativa con un aminoácido de "reemplazo" diferente.

El término "inserción de aminoácidos" hace referencia a la inserción de uno o más aminoácidos adicionales en una secuencia de aminoácidos predeterminada o nativa. La inserción puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta veinte residuos de aminoácidos.

El término "deleción de aminoácidos" hace referencia a la remoción de al menos un aminoácido de una secuencia de aminoácidos predeterminada o nativa. La deleción puede ser uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta veinte residuos de aminoácidos.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera indistinta en la presente y hacen referencia a un polímero de los residuos de aminoácidos. Los términos aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más

aminoácidos son un aminoácido no natural, un aminoácido sintético o un aminoácido mimético.

El término "ácido nucleico" hace referencia a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido y a sus polímeros en ya sea una forma de cadena simple o doble. El término "ácido nucleico" se usa en forma indistinta con genes, nucleótidos, polinucleótidos, ADNc, ADN y ARNm. A menos que específicamente se encuentre limitado, el término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos naturales conocidos que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico natural. A menos que se limite específicamente, una secuencia de nucleótidos particular también abarca sus variantes conservativamente modificadas (por ejemplo, aquellas que contienen sustituciones de codones redundantes) y secuencias complementarias como también las secuencias específicamente descritas.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden estar formados por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar formados por regiones con cadena simple o doble, regiones con cadena simple o doble combinadas. Además, los polinucleótidos pueden presentar regiones con cadena triple que contienen ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos modificados incluyen bases modificadas, tales como bases tritoladas o bases inusuales tales como inosina. Una variedad de modificaciones pueden realizarse al ARN o ADN, entonces el polinucleótido incluye formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

El término "derivatizado" o "derivado" hace referencia a un compuesto, es decir, proteínas de fusión que tienen una porción cíclica, por ejemplo, entrecruzada entre residuos de cisteinil, el compuesto, es decir, la proteína de función, está entrecruzado, uno o más enlaces de peptidilo se sustituyen por un enlace no peptídico, o el extremo N terminal se sustituye por un NRR_1 , NRC(O)R_1 , NRC(O)OR_1 , NHC(O)NHR_1 , $\text{NRS(O)}_2\text{R}_2$, succinamida u otro grupo en donde R y R_1 se definen en la presente y/o el extremo C terminal se sustituye con C(O)R_3 o NR_4R_5 , y el compuesto, es decir, la proteína de fusión en la que los restos de aminoácidos están modificados por el tratamiento con agentes capaces de reaccionar con las cadenas secundarias seleccionadas o los residuos terminales. R se selecciona a partir del grupo que está formado por hidrógeno y alquilo C_{1-6} , R_1 se selecciona a

partir del grupo que está formado por hidrógeno y alquilo C_{1-6} , R_2 se selecciona a partir del grupo que está formado por alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , y fenilo opcionalmente sustituido; R_3 se selecciona a partir del grupo que está formado por hidrógeno, alquilo C_{1-6} , y cicloalquilo C_{3-8} ; R_4 se selecciona a partir del grupo que está formado por hidrógeno y alquilo C_{1-6} ; R_5 se selecciona a partir del grupo que está formado por hidrógeno, alquilo C_{1-6} y cicloalquilo C_{3-8} ; o R_4 y R_5 se toman juntos con el nitrógeno al cual están unidos para formar un anillo de 4 a 7 miembros saturado, que opcionalmente tiene 1 heteroátomo anular adicional seleccionado a partir del grupo N, O y S.

El término "alquilo C_{1-6} " hace referencia a una cadena de alquilo recta o ramificada de uno a seis átomos de carbono.

El término "cicloalquilo C_{3-8} " hace referencia a un anillo de alquilo monocíclico o bicíclico, saturado o parcialmente (pero no completamente) insaturado de tres a ocho átomos de carbono, e incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. Se entiende que el término incluye ciclopentilo y ciclohexilo benzofusionados.

El término "fenilo opcionalmente sustituido" hace referencia a un grupo fenilo opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados a partir del grupo que está formado por halo, alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , ciano y trifluorometilo.

PREPARACIÓN

Los compuestos, es decir, las proteínas de fusión de esta invención pueden prepararse por métodos sintéticos estándar, técnicas de ADN recombinante u otros métodos para preparar los péptidos y las proteínas de fusión. En un proceso ejemplar un dominio hUTI está covalentemente unido a un dominio Fc por la expresión de un constructo de ADN que codifica el dominio UTI y el dominio Fc y todo dominio enlazador.

Se prevén maneras alternativas de construir una proteína de fusión UTI. En algunas realizaciones, la orientación del dominio puede alterarse para construir una molécula Fc-UTI o una molécula UTI-Fc o una molécula UTI-Fc-UTI que conserve la unión FcR y tenga un dominio UTI activo.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión UTI incluyen un dominio Fc de tipo salvaje que puede permitir que la proteína de fusión experimente endocitosis tras la unión a FcRn (receptor Fc neonatal). Así, la presente invención además

proporciona métodos para producir las proteínas de fusión UTI divulgadas. Estos métodos abarcan el cultivo de una célula huésped que contiene los ácidos nucleicos aislados que codifican las proteínas de fusión UTI de la invención. Como apreciarán aquellos expertos en la técnica, esto puede realizarse de diversas maneras, dependiendo de la naturaleza de la proteína de fusión UTI. En algunas realizaciones, se produce la proteína de fusión UTI de la invención y puede aislarse.

En general, se proveen los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión UTI de la invención. Dichos polinucleótidos codifican un dominio UTI, el compañero de fusión y todo dominio enlazador. La presente invención también contempla los fragmentos de oligonucleótidos que derivan de los polinucleótidos divulgados y las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a estos polinucleótidos.

Los polinucleótidos pueden estar en la forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos en la forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácidos nucleico y ADN sintético están dentro del alcance de la presente invención. El ADN puede ser de cadena doble o de cadena simple, y si es de cadena simple, puede ser la cadena codificadora (sentido) o la cadena no codificadora (antisentido). La secuencia codificadora que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificadora provista en la presente o puede ser una secuencia codificadora diferente, que, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica los mismos polipéptidos que el ADN provisto en la presente.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión UTI de la invención se incorporan en los vectores de expresión, que pueden ser extracromosómicos o estar diseñados para integrarse en el genoma de la célula huésped en la que se introducen. Los vectores de expresión pueden contener toda cantidad de secuencias regulatorias apropiadas (incluso, sin limitación, secuencias de control transcripcionales y translacionales, promotores, sitios de unión ribosómico, potenciadores, orígenes de replicación, etc) u otros componentes (genes de selección, etc.), todos los cuales están operablemente unidos como bien se sabe en la técnica. En algunos casos, se usan dos ácidos nucleicos y cada uno puesto en un vector de expresión diferentes (p. ej., cadena pesada en un primer vector de expresión, cadena ligera en un segundo vector de expresión), o alternativamente pueden estar puestos en el mismo vector de expresión. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que el diseño de los vectores de expresión, incluso la selección de secuencias regulatorias puede depender de factores tales

como la elección de la célula huésped, el nivel de expresión de proteína deseado, etc.

En general, los ácidos nucleicos y/o la expresión se puede introducir en una célula huésped adecuada para crear una célula huésped recombinante mediante el uso de todo método apropiado para la célula huésped seleccionada (p. ej., transformación, transfección, electroporación, infección), de manera que las moléculas de ácido nucleico se unan operativamente a uno o más elementos de control de expresión (p. ej. en un vector, en un constructo creado por los procesos en la célula, integrados en el genoma de la célula huésped). La célula huésped recombinante resultante puede mantenerse bajo condiciones adecuadas para la expresión (p. ej., en la presencia de un inductor, en un animal no humano adecuado, en un medio de cultivo adecuado complementado con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, complementos nutricionales, etc), en donde se producen los polipéptidos codificados. En algunos casos, se introducen cadenas pesadas en una célula y la cadena ligera en otra.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión se conocen en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles a partir de la Colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA que incluyen pero no se limitan a células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK 293, células NSO, células HeLa, células de riñón de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células del carcinoma hepatocelular humano (p. ej., HepG2) y una cantidad de otras líneas celulares. Las células que no pertenecen a mamíferos que incluyen pero no se limitan a células bacterianas, de levaduras, insecto y plantas pueden también utilizarse para expresar anticuerpos recombinantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos tales como vacas o pollos.

En una realización, las proteínas de fusión de la invención se codifican por una secuencia de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden ser útiles para una cantidad de aplicaciones, que incluyen: clonación, terapia génica, expresión y purificación de proteínas, introducción de mutación, vacuna de ADN de un huésped que lo necesita, generación de anticuerpos para, p. ej., inmunización pasiva, PCR, generación de cebador y sonda, diseño y generación de ARNip y similares. En una realización, la secuencia de nucleótidos de la invención comprende, está formada por o consta esencialmente de, una secuencia de

nucleótidos seleccionada a partir de la SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, o 32.

En una realización, una secuencia de nucleótidos incluye una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en la SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, o 32. En una realización, una secuencia de nucleótidos incluye una secuencia de nucleótidos contigua al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, o 32.

Las proteínas de fusión UTI preferidas de la invención comprenden una secuencia (p. ej. al menos un dominio Fc) derivada de una secuencia de inmunoglobulina humana. Sin embargo, las secuencias pueden comprender una o más secuencias de otras especies de mamíferos. Por ejemplo, un dominio Fc de primate o un dominio de nucleasa pueden incluirse en la secuencia del sujeto. En forma alternativa, uno o más aminoácidos murino pueden estar presentes en un polipéptido. En algunas realizaciones, las secuencias de polipéptidos de la invención no son inmunogénicas y/o presentan una inmunogenicidad reducida. Las proteínas de fusión UTI de la invención pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos de aminoácidos, p. ej. en residuos de aminoácidos esenciales o no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la que el residuo de aminoácidos se sustituye con un residuo de aminoácidos con una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, e incluyen cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas por beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, un residuo de aminoácidos no esencial en un polipéptido de unión se sustituye preferentemente por otro residuo de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, una cadena

de aminoácidos puede sustituirse con una cadena estructuralmente similar que difiere en orden y/o composición de los miembros de la cadena lateral. En forma alternativa, en otra realización, se pueden introducir mutaciones en forma aleatoria en toda o parte de una secuencia codificadora, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden incorporarse en los polipéptidos de unión de la invención y seleccionarse por su capacidad de unirse a la diana deseada.

USOS

En algunas realizaciones, la invención provee métodos para diagnosticar y tratar condiciones relacionadas con el UTI. Como se utilizan en la presente "condiciones", "trastornos" y "enfermedades" hacen referencia a un estado no saludable o anormal. El término "condiciones relacionadas con UTI" incluye condiciones, trastornos y enfermedades en las que UTI provee un beneficio terapéutico. El término "condiciones relacionadas con UTI" incluye condiciones caracterizadas por un efecto inmunomodulador o inflamatorio. En particular, el término condiciones relacionadas con UTI incluye pancreatitis, que incluye pancreatitis aguda y pancreatitis crónica, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, insuficiencia circulatoria aguda (p. ej, provocada por coque), coagulación intravascular diseminada y síndrome de disfunción multiorgánica. El término condiciones relacionadas con UTI también incluye el uso en pacientes quirúrgicos de alto riesgo. El término condiciones relacionadas con UTI incluye infecciones de pulmón, hígado, corazón o riñón. El término condiciones relacionadas con UTI también incluye sepsis grave. El término condiciones relacionadas con UTI también incluye lesión pulmonar aguda (Acute Lung Injury, ALI) provocada por virus SARS o síndrome de distrés respiratorio agudo (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS).

En una realización, la invención provee métodos para tratar una condición relacionada con UTI, que comprenden administrar a un paciente que lo necesita una cantidad efectiva, p. ej., una cantidad farmacéuticamente efectiva, de una proteína de fusión UTI divulgada. En ciertas realizaciones, la condición es una especialmente mencionada aquí.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan de una manera conocida en la técnica farmacéutica e incluyen al menos una de las proteínas de fusión UTI de la invención como ingrediente activo. La composición

farmacéutica de las proteínas de fusión UTI utilizadas conforme con la presente invención se prepara al mezclar una proteína de fusión UTI que tiene el grado deseado de pureza con excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. El término "excipientes farmacéuticamente aceptable" hace referencia a aquellos típicamente usados en la preparación de composiciones farmacéuticas y debería ser farmacéuticamente puro y no tóxico en las cantidades en que se utiliza. Por lo general son materiales sólidos, semisólidos o líquidos en los que el agregado puede servir como un vehículo o medio para el ingrediente activo. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables se encuentran en Remington: Pharmaceutical Sciences and the Handbook of Pharmaceutical Excipients e incluyen diluyentes, vehículos, portadores, matrices de liberación sostenida, agentes estabilizadores, conservantes, disolventes, agentes de suspensión, tampones, emulsionantes, tintes, propelentes, agentes de recubrimiento y otros. Por lo general para la administración intravenosa o por inyección las proteínas de fusión UTI de la presente invención se encuentran en la forma de formulaciones liofilizadas, o soluciones acuosas.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para los sujetos en las cantidades utilizadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol de butilo o bencilo; alquil parabenos tales como metal o propel parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina en suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraponos formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (p.ej., complejos de proteínas Zn); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas de la presente también pueden contener más de un ingrediente activo, es decir, proteína de fusión, según sea necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferiblemente aquellos con actividades

complementarias que no afectan de manera adversa al otro. Dichas moléculas están presentes en forma adecuada en combinación en cantidades que son efectivas para los fines pretendidos.

Las composiciones farmacéuticas a utilizar para la administración *in vivo* deberían ser estériles o casi. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las proteínas de fusión UTI de la invención se administran a un sujeto, conforme con métodos conocidos, tal como la administración intravenosa como bolo o por la infusión continua durante un período de tiempo, mediante inyección intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal o infusión o vías tópicas o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea de la proteína de fusión UTI.

Los términos "tratar", "tratamiento" y "trata" incluyen mejorar las condiciones descritas en la presente. Los términos "tratar", "tratamiento" y "trata" incluyen todos los procesos que proveen una desaceleración, interrupción, detención, control o parada del estado o progresión de las condiciones descritas en la presente, pero no necesariamente indican una eliminación total de todos los síntomas o una cura de la condición. Los términos "tratar", "tratamiento" y "trata" tienen por objeto incluir el tratamiento terapéutico de dichos trastornos. Los términos "tratar", "tratamiento" y "trata" tienen por objeto incluir el tratamiento terapéutico de dichos trastornos.

Como se utiliza en la presente, los términos "paciente" y "sujeto" incluyen seres humanos y animales no humanos, por ejemplo, mamíferos, tales como ratones, ratas, cobayos, perros, gatos, conejos, vacas, caballos, ovejas, cabras y cerdos. El término también incluye aves, peces, reptiles, anfibios y similares. Se entiende que un paciente más particular es un ser humano. También, pacientes y sujetos más particulares son los mamíferos no humanos, tales como ratones, ratas y perros.

Tal como se utiliza en la presente, el término "cantidad eficaz" hace referencia a la cantidad de compuesto es decir, proteína de fusión de la invención que trata, tras una administración de dosis única o múltiple, a un paciente que sufre de la condición mencionada. Una cantidad efectiva puede ser determinada con facilidad por el especialista en diagnóstico tratante como un profesional médico, tal como un médico o un veterinario como un experto en la técnica, mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos bajo

circunstancias análogas. Por ejemplo, un profesional médico podría comenzar las dosis del medicamento empleado en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y gradualmente incrementar la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

En la determinación de la cantidad efectiva, en la dosis, se consideran una cantidad de factores por parte del especialista en diagnóstico, incluso, pero no se limita a: las especies de pacientes, su tamaño, edad y salud en general; la condición específica, trastorno o enfermedad involucrada, el grado de o la implicación o la gravedad de la condición, el trastorno, o la enfermedad, la respuesta del paciente individual, el compuesto en particular, es decir, la proteína de fusión, administrada; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicamentos concomitantes y otras circunstancias relevantes. Pueden determinarse cantidades específicas por los expertos en la técnica. Si bien estas dosificaciones se basan en sujetos humanos promedio con una masa de 60 kg a aproximadamente 70 kg, el médico podrá determinar la dosis apropiada para un paciente (p. ej., un infante) donde la masa se encuentra fuera de este rango de peso.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proveer la respuesta deseada. Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se puede administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según lo indican las exigencias de la situación terapéutica.

Las composiciones parenterales pueden formularse en una forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza en la presente hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, es decir, proteína de fusión, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

Las composiciones farmacéuticas de la presente se formulan preferentemente en una forma de dosificación unitaria, cada dosis por lo general contiene desde aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg de una proteína de fusión UTI de la invención. El término "forma de dosificación unitaria" hace referencia a una unidad físicamente discreta que contiene una cantidad predeterminada de ingrediente activo, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado,

mediante el cual uno o más se usan a través de los regímenes de dosificación para producir el efecto terapéutico deseado. Una o más "formas de dosificación unitaria" pueden tomarse para afectar la dosis de tratamiento.

Un rango no limitante ejemplar para una cantidad efectiva de una proteína de fusión UTI utilizada en la presente invención es aproximadamente 0,1–100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1–50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,1–20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1–10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente tal como 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, o aproximadamente 3 mg/kg. En otra realización, la proteína de fusión UTI se administra en una dosis de 1 mg/kg o más, tal como una dosis de desde 1 a 20 mg/kg, p. ej., una dosis de desde 5 a 20 mg/kg, p. ej., una dosis de 8 mg/kg. Un rango ejemplar no limitante para una cantidad efectiva de una proteína de fusión UTI utilizada en la presente invención es aproximadamente 1–500 mg/dosis, tal como aproximadamente 1–100 mg/dosis, por ejemplo aproximadamente 1–50 mg/dosis, tal como aproximadamente 1–10 mg/dosis, por ejemplo aproximadamente 1 mg/dosis, o aproximadamente 3 mg/dosis, o aproximadamente 5 mg/dosis.

En una realización, la proteína de fusión UTI se administra por infusión en una dosificación de cada 3 días o semanalmente de desde 10 a 500 mg/dosis. Dicha administración puede repetirse según sea necesario para mantener el efecto terapéutico deseado.

Como ejemplos no limitantes, el tratamiento conforme con la presente invención puede proveerse como una dosificación de la proteína de fusión UTI en una cantidad de aproximadamente 0,1–100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 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, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno por día; 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, o 40 mg/kg, o alternativamente, al menos una vez por semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mg/kg después del comienzo del tratamiento o cualquiera de sus combinaciones. Como ejemplos no limitantes, el tratamiento conforme con la presente invención puede ser provisto como una dosificación de la proteína de fusión UTI en una cantidad de aproximadamente 1–100 mg/dosificación, tal como 1, 5, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 150, 200, 250, 300, 350, o 400 mg/dosificación. En al menos una vez por día 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, o 40 mg/dosificación después del comienzo del tratamiento, o cualquiera de sus combinaciones. En al menos uno por semana 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mg/dosificación después del comienzo del tratamiento, o cualquiera de sus combinaciones.

Las proteínas de fusión UTI de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones, incluso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con UTI. Las proteínas de fusión UTI de la invención encuentran uso en el tratamiento de enfermedades con involucramiento del sistema inmune, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, respuestas inflamatorias posoperatorias, enfermedades asociadas con lisosoma, enfermedades de coagulación, enfermedades relacionadas con la proteasa y como terapia adyuvante durante la cirugía. Las proteínas de fusión UTI de la invención pueden encontrar uso en el tratamiento de pancreatitis (incluso pancreatitis inducida por endoscopia y pancreatitis aguda), artritis, ASARS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, insuficiencia circulatoria agua, sepsis, hepatitis, apendicitis, colitis, insuficiencia orgánica, daño orgánico (incluso páncreas, riñón, pulmón), lesión por reperfusión, síndrome de Stevens–Johnson, necrólisis epidérmica tóxica, shock, lesiones isquémicas, lesión pulmonar aguda (incluso aquella provocada por disección aórtica aguda) , asma, inflamación pulmonar, neumonía (incluso asociada al ventilador), coagulación intravascular diseminada (DIC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

Las proteínas de fusión UTI de la presente invención pueden encontrar uso en las proteasas inhibidoras, incluso las serina proteasas, incluso, tripsina, quimoripsina, trombina, calicreína, plasmina, elastasa, catepsina, lipasa, hialuronidasa, factores IXa, Xa, XIa, y XIIa, y elastasa leucocitaria polimorfonuclear.

Las proteínas de fusión UTI de la presente invención pueden encontrar uso en la supresión de mediadores proinflamatorios, tales como citocinas, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina–1, –1 β , –4, –6 y –8, –10 y quimiocinas.

Las proteínas de fusión UTI de la presente invención pueden encontrar uso en el tratamiento del cáncer, incluso la prevención de la invasión tumoral y metástasis, índices alterados de apoptosis, y reducción de la pérdida de la función renal en el tratamiento con cisplatino.

Las proteínas de fusión UTI de la presente invención encuentran uso para tratar el SIDA, incluso como tratamiento adyuvante.

EJEMPLOS

A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos a continuación se ofrecen con fines ilustrativos solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención en ninguna forma. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se deberían permitir, por supuesto, algunos errores y desviaciones experimentales. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, los métodos convencionales de la química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, p. ej., T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc.); Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3.º edición (Plenum Press) Vol A y B (1992).

EJEMPLO 1: Construcción de vectores de ADN que codifican las proteínas de fusión UTI.

Los métodos para realizar biología molecular se conocen en la técnica y pueden encontrarse por ejemplo, en *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 4.º edición (Micheal Green and Joseph Sambrook, Cold Spring Harbor Press, 2012).

Un gen que codifica UTI–Fc1 se ordenó usando los servicios de síntesis de genes optimizada por codón GeneArt de Life Technologies (Carlsbad, CA). La secuencia de proteína es según se enumera en SEQ ID NO: 1 con un péptido de señal, MGWSCILFLVATATGVHS, agregado para secreción. La Figura 1 muestra las regiones generales de UTI utilizadas en la fusión. El gen que codifica UTI–Fc1 se ligó en un vector de expresión de mamíferos. Los vectores de expresión de mamíferos se conocen en la técnica, incluso vectores pSecTag2/Hygro A, pcDNA4 y pcDNA6 (Life Technologies, Carlsbad CA). El vector se degradó con las enzimas de restricción, HindIII–HF y EcoRI de New England Biolabs (NEB). Este fragmento se ligó en el vector de expresión que provee resistencia a carbenicilina y se degradó

con las mismas dos enzimas de restricción. Una relación molar de vector inserto de 1:3 se usó en la ligación. El ADN ligado se transformó en células E.coli competentes químicamente con 10–beta de NEG y se colocaron en placas LB con carbenicilina para que crezcan durante toda la noche. Las colonias crecieron durante toda la noche en LB con carbenicilina y ADN miniprep se preparó con el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany). Luego se secuenció el ADN usando servicios de secuenciamiento de ADN de Bio Applied Technologies Joint (BATJ, San Diego). La colonia verificada por secuencia se desarrolló posteriormente en medio LB con carbenicilina para la purificación del ADN con el instrumento BenchPro 2100 y MaxiCard de Life Technologies.

EJEMPLO 2: Construcción de vectores de ADN que codifican las proteínas de fusión UTI–Fc.

SEQ ID NO:1–28 enumeran las secuencias de ADN y proteínas de algunas proteínas de fusión UTI–Fc. Estas proteínas de fusión UTI comprenden modificaciones que alteran los isotipos Ig, enlazadores, dominios UTI, y orden de dominio UTI y FC (extremo N o C terminal), especies UTI, especies Fc, residuo de inicio/parada de UTI, enlaces a azúcar, sitios sensibles a proteasa, y función efectora Fc. Algunas proteínas UTI–Fc se describen en las Figuras 2 y 3. Las proteínas de fusión UTI–Fc que comprenden tres modificaciones de aminoácidos a Ser (IgG1 Fc3Ser, C154S/P172S/P265S) comprende mutaciones para alternar la formación del enlace disulfuro y las funciones FcγR.

Creación de los constructos de expresión UTI–Fc

Las secuencias de nucleótidos de UTI (p. ej., variantes de tipo salvaje, S10A, y K21S K22S) y dominios humanos Fc3Ser se optimizaron por codones para la expresión de células CHO y se sintetizaron por Life Technologies (Carlsbad, CA). Los siguientes constructos se crearon en un vector de expresión CHO mediante el ensamble de dominios UTI y Fc3Ser mediante un método de clonación independiente de ligación y secuencia (SLIC) (Li and Elledge 2007 Nature Methods 4(3):251–256): UTI–Fc3Ser, UTI S10A–Fc3Ser, UTI K21S K22S–Fc3Ser, UTI m2–Fc3Ser, UTI L1–Fc3Ser, UTI L2–Fc3Ser (Figura 4A). El ensamblaje de ADN basado en SLIC se realizó al mezclar los vectores linearizados (30 ng), UTI (100 ng) y Fc3Ser (100 ng), productos de PCR, con secuencias protuberantes apropiadas para la recombinación homóloga, y polimerasa de ADN T4 (0,5 U) en un volumen de 5 µL que contiene NEBuffer 2 y BSA (New England Biolabs). Después de una

incubación por 30 minutos a temperatura ambiente, la actividad de exonucleasa de ADN polimerasa T4 se neutralizó al agregar 2 mM de dCTP. Luego se realizó la recombinación homóloga in vitro por gradiente de temperatura de 75°C a 37°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción que contiene ADN ensamblado se transformó químicamente en TOP10 *E. coli* (Invitrogen), y se colocó en placas de LB agar con carbenicilina. Los marcos de lectura abiertos para los constructos restantes (UTI m1–Fc3Ser, UTI d1–Fc3Ser, UTI d2–Fc3Ser, UTI L3–Fc3Ser, UTI–Fc IgG2, Fc3Ser–UTI, y UTI ratón –IgG1ratón) se optimizaron en cuanto al codón y se sintetizaron como constructor de fusión. Estos constructos se clonaron en los vectores de expresión con métodos SLIC como se describió anteriormente (Figura 4B). Las secuencias de ADN de todos los 13 constructos en el vector se verificaron por secuenciación de ADN de Sanger.

EJEMPLO 3: Expresión de las fusiones UTI–Fc en células CHO.

Un vector de ADN que codifica UTI–Fc1 se transfectó establemente en células CHO–S con reactivo Freestyle MAX de Invitrogen. Los cultivos en masa se plantaron en matraces T y se seleccionaron usando CD CHO complementado con diversas concentraciones de metionina sulfoximina (MSX) que varía de 50–100 µM. Una vez que los cultivos se recuperaron de la selección, se expandieron para la producción y criopreservación. Se realizaron lotes de producción múltiple para soportar las pruebas in vitro e in vivo. El proceso de producción es un cultivo en lote alimentado de 10 a 14 días con CD FortiCHO, CD Efficient Feed B, y CD Efficient Feed C de Invitrogen. Los volúmenes de producción varían de 1L a 3L y los cultivos se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm durante 1 a 2 horas seguidos por la filtración estéril de supernadante y el supernadante de célula resultante se usó en la purificación.

EJEMPLO 4: Purificación de proteínas de fusión UTI–Fc.

La purificación de 2 lotes de UTI–Fc1 se realizó al aplicar 2,3 litros de medio acondicionado con células CHO con UTI–Fc1 expresada a 30 ml proteína A mAb select lx (GE healthcare) equilibrada en 25 mM citrato trisódico pH 8,1, 125mM NaCl. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna (60ml) 25mM citrato trisódico pH 8,1, 125mM NaCl y luego con 2 volúmenes de columna (60ml) 25mM citrato trisódico pH 8,1, 2000mM NaCl. La columna se equilibró luego con 2 volúmenes de columna (60ml) 25mM citrato trisódico pH 8,1, 125mM NaCl. UTI–Fc1 se eluyó con gradiente en 7 volúmenes de columna (210 ml) a 100% 25 mM

ácido cítrico pH 2,9, 125mM NaCl. UTI–Fc1 eluyó como dos picos, un pico amplio y flanqueante en un pH aproximado de 5,5 y un pico más agudo a un pH aproximado de 3,5. Luego, UTI–Fc concentrado se sometió a intercambio de tampón en un tampón final de TBS pH 7,4 (25mM tris, 130mM NaCl, 2,7 mM KCl pH 7,4) con concentradores centrífugos Amicon Ultra con un corte de peso molecular de 30K. El rendimiento de la proteína purificada se muestra en la TABLA 1 y la proteína se almacenó a –80 °C para su uso posterior.

TABLA 1

Nombre de pico	Volumen de pico (mL)	Concentración del producto final (mg/mL)	Rendimiento del producto final (mg)	Rendimiento columna proteína A (%)	% de la carga de proteínas total
1.º pico de lote	40	10	110	59	52
2.º pico de lote	40	11	150	72	68

EJEMPLO 5: Expresión y purificación de proteínas de fusión UTI–Fc adicionales.

En el día de la transfección, las células CHO se contaron y sembraron a una densidad de 2,2x10^6 células vivas/mL en 90 % del volumen total– 900mL y se cultivaron en matraces oscilantes a 33°C hasta la transfección. Se descongeló el ADN congelado y se agregó a PEI (Polietilenimina–polímero catiónico) y AKT. Se agregó ADN a 0,625 ug/ 1 millón de células. 1L de células requiere 1,25 mg. 90 % del ADN total agregado es ADN de interés = 1,125 mg. El restante 10 % fue AKT (codifica proteína antiapoptótica) = 0,125 mg. Se agregó PEI a 2,5 ug/ 1 millón de células. Para una transfección de 1L esto fue 5mg. La solución PEI se agregó a ADN diluido y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de la adición de complejo de ADN a las células.

Los cultivos crecieron a 33 °C, 5% CO2 y 125rpm. 1 a 4 horas posteriores a la transfección, se agregó 0,6mM de ácido Valproico. Para la transfección de 1L, esto fue 2 mL de 300mM de solución madre. En el día 1, se agregó 1:250 de agente antiaglomerante es decir 4 mL /1L y 15% v/v CD Efficient Feed C es decir 150mL/1L. En el día 5 y el día 9 se agregó 15 % de CD Efficient Feed C.

Las supernadantes de células se cosecharon el día 14, las células se contaron y se determinaron los títulos de las proteínas. Las células se centrifugaron por

centrifugación a 300 rpm durante 30 minutos a 4°C. Los supernadantes se filtraron a través de un filtro de 0,2 micrones y se almacenaron a 4 °C o se congelaron a –20 °C.

La purificación de las fusiones UTI–Fc se realizó por cromatografía de Proteína A. 200 mL de supernadante de cultivo celular se mezcló con 2 ml de microesferas de sefarosa de proteína A MabSelect Sure y se agitaron durante toda la noche a 4 °C. La mezcla de microesferas luego se centrifugó en tubos de 50 ml a 1200 rpm durante 5 minutos y se desechó el supernadante. Las microesferas se agregaron a una columna y se lavaron tres veces con tampón de unión (Biorad, Hercules, CA). Las fusiones de UTI se eluyeron con 8 mml de tampón de elución MAPS II (Biorad, Hercules, CA). Se agregó 2 ml de solución neutralizante (1M Tris–HCl pH 8). Las muestras fueron luego sometidas a intercambio de tampón en 25 mM Citrato, 125mM NaCl, pH 5,5 por concentración y dilución repetida con el tampón con unidades centrífugas Amicon (30MWCO, 15 mL, Millipore). La figura 9 enumera los resultados de purificación de diversas proteínas de fusión UTI.

EJEMPLO 6: Inhibición de las proteasas por las proteínas de fusión UTI.

Ensayo enzimático in vitro para la inhibición de tripsina por proteína de fusión UTI–Fc

Las soluciones de UTI–Fc1 a diversas concentraciones (≤ 200 nM de la concentración final) se prepararon en 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂ y 0,01% Brij L23, pH 7,4. Se realizaron ensayos de actividad en placas de volumen pequeño de 384 cavidades Greiner. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

La tripsina pancreática humana (concentración final de 1,5 nM) (Athens Research & Technology, Inc) se agregó a las diluciones, luego se preincubó con el UTI–Fc de prueba durante 15 minutos. Luego, la reacción se inició con 100 μ M (final) de sustrato clorhidrato de N α –Benzoil–L–arginina–7–amido–4–metilcoumarina SIGMA B7260–25MG. El volumen total de la mezcla de reacción fue 20 μ l. Se determinó la actividad de tripsina mediante fluorescencia. Por ejemplo, la intensidad de fluorescencia se determinó en modo cinético a través de una ventana de 30 a 60 minutos en un BMG PHERAstar FS o PHERAstar, además usando una longitud de onda de excitación de 370 nm y una longitud de onda de emisión de 470 nm. La actividad de tripsina fue proporcional linealmente al cambio en la fluorescencia

observada (final – inicial). El porcentaje de inhibición de Tripsina a una concentración de UTI–Fc dada se definió como:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 * (1 - ((F_i - F_p) / (F_n - F_p)))$$

En donde: F_i fue la fluorescencia observada a una concentración dada de UTI–Fc de prueba.

F_p fue la fluorescencia observada de un control positivo es decir, el valor promedio de 2 a 6 ensayos en ausencia de Tripsina.

F_n fue la fluorescencia observada de un control negativo es decir, el valor promedio de 2 a 6 ensayos de Tripsina en presencia del vehículo solo.

La IC₅₀ (la concentración molar del compuesto, es decir, la proteína de fusión, que produce una inhibición del 50 %) de un compuesto de prueba, es decir, proteína de fusión, se calculó por ajuste de la curva de los mínimos cuadrados lineales de la ecuación de inhibición porcentual = $P_{ie} + ((C_{ima} - P_{ie}) / (1 + ((IC_{50} / [UTI-Fc]) ^ {Pendiente})))$. Incluido dentro del panel de UTI–Fc hubo un control positivo. Como se ilustra en la Figura 5, humanUTI tuvo una IC₅₀ de ~3 nM.

La medición de las inhibiciones de otras proteasas por UTI–Fc1 también se midió en Reaction Biology Corporation (Malvern, PA). La Figura 6 demuestra una inhibición de UTI–Fc1 de quimotripsina. La Figura 7 indica las constantes inhibitorias de UTI–Fc1 para una variedad de proteasas. La UTI–Fc1 inhibe la quimotripsina y plasmina en forma moderada y muestra una débil inhibición de caspasa–1, catepsina C y papaína.

EJEMPLO 7: Efectos celulares del tratamiento con las proteínas de fusión UTI.

La inhibición de UTI–Fc1 de la liberación de citocina se midió en un ensayo basado en células. Las células BEAS2B se sembraron a la densidad de 20.000 células/cavidad en una placa de 96 cavidades y se cultivaron con un BEGM BulletKit (Lonza) completo en incubador de CO₂. Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con DMEM puro la privación y las células se cultivaron toda la noche. Luego las células se incubaron con DMEM puro nuevo con 100nM tripsina con diversas concentraciones de UTI en orina humana o proteínas UTI–Fc1 recombinantes. Tras 8 horas, los supernadantes del cultivo se recolectaron y se evaluaron los niveles de proteína IL–6 con DuoSet (R&D Systems) para IL–6 humana.

Los resultados demuestran que tanto UTI como UTI–Fc disminuyeron la producción de IL–6 inducida por tripsina en células BEAS2B. Como se ilustra en la

Figura 8, la inhibición fue dependiente de la dosis con valores de IC50 de 0,40 y 0,41 µg/mL, respectivamente.

EJEMPLO 8

Mediciones de estabilidad de moléculas UTI–Fc – Desnaturalización térmica

Se realizaron ensayos para medir la estabilidad térmica y la estabilidad en tiempo real. Todas las moléculas demostraron actividad en la inhibición de tripsina. Se midió la estabilidad térmica por calorimetría de barrido diferencial en un calorímetro Microcal VP–DSC. Las muestras se prepararon a 1 mg/ml y se tamponaron en 0,25 mM Tris pH7,4, 0,13M NaCl y 0,0027M KCl. Las muestras se calentaron de 25°C a 110°C a una velocidad de 200 °C por hora. UTI–Fc1 se comparó con la Publicación de solicitud número CN 103044554 A, SEQ ID 2 y 6, que comprende un dominio Fc IgG2 o IgG1 respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Proteína	DSC Tm1 (oC)	DSC Tm2 (oC)
UTI–Fc1 (SEQ ID NO:1)	70,86	85,79
CN 103044554 A SEQ ID 6	68,72	86,38
CN 103044554 A SEQ ID 2	68,47	79,22

EJEMPLO 9

Mediciones de estabilidad en tiempo real

Se realizaron las mediciones de la estabilidad en tiempo real al incubar la SEQ ID NO:1 (UTI–Fc1) o CN 103044554 A, SEQ ID 2 o 6 a 2–8 °C, y 40 °C durante 0, 2 y 4 semanas en TBS, tampón pH 7,4. La formación de especies con pesos moleculares superiores o inferiores se determinó mediante cromatografía pro exclusión de tamaño (SEC) y se visualizó con electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). La concentración de cada UTI–Fc también se monitoreó por determinación de la absorbancia de la solución a 280 nm (A280), con coeficientes de extinción determinados por la composición de las proteínas. Las moléculas de UTI–Fc producen dos picos parcialmente superpuestos, cuando se analizan por SEC. El área de pico porcentual en cada muestra de UTI–Fc medida por SEC se informó en la Tabla 3 en tiempo = 0 semanas, 2 semanas y 4 semanas. También se ilustra el cambio porcentual en la concentración medido por A280 (% Δ (mg/ml)) en tiempo = 2 semanas y 4 semanas. La concentración inicial T0 de cada muestra fue UTI–Fc1 = 33,5mg/mL, CN 103044554 A SEQ ID 2 = 8,5mg/mL, y CN 103044554 A SEQ ID 6 =

5,6mg/mL. Una variabilidad de 3% es típica para SEC y 15% para las mediciones de UV individuales. El análisis por PAGE mostró que cada molécula UTI–Fc mostró el patrón de bandas esperado para UTI–Fc de longitud completa.

TABLA 3.

Proteína	SEC 0 semanas	SEC 2 semanas	SEC 4 semanas	% Δ (mg/ml) 2semanas	% Δ (mg/ml) 4 semanas
UTI–Fc1 (SEQ ID NO:1)	Pico1 35,7% Pico2 64,3%	NA		NA	NA
UTI–Fc1 (SEQ ID NO:1) a 2–8°C	NA	Pico1 36,2% Pico2 63,8%	Pico1 36,1% Pico2 63,9%	9,2%	1,2%
UTI–Fc1 (SEQ ID NO:1) a 40°C	NA	Pico1 37,1% Pico2 62,9%	Pico1 36,8% Pico2 63,2%	0,2%	11,9%
CN 103044554 A SEQ ID 2	Pico1 30,6% Pico2 69,4%	NA	NA	NA	NA
CN 103044554 A SEQ ID 2 a 2– 8°C	NA	Pico1 29,0% Pico2 71,0%	Pico1 31,5% Pico2 68,5%	0,2%	2,7%
CN 103044554 A SEQ ID 2 a 40°C	NA	Pico1 28,2% Pico2 71,8%	Pico1 30,3% Pico2 69,7%	1,6%	3,5%
CN 103044554 A SEQ ID 6	Pico 1 36,6% Pico 2 63,4%	NA	NA	NA	NA
CN 103044554 A SEQ ID 6 a 2– 8°C	NA	Pico1 34,8% Pico2 65,2%	Pico1 36,4% Pico2 63,6%	7,8%	9,5%

CN 103044554 A SEQ ID 6 a 40°C	NA	Pico1 33,9% Pico2 66,1%	Pico1 34,5% Pico2 65,5%	3,6%	6,0%
-----------------------------------	----	----------------------------------	----------------------------------	------	------

EJEMPLO 10

Pruebas in vivo de la inhibición complementaria.

Se midieron los impactos de UTI–Fc1 (SEQ ID NO:1) en el sistema de complementos in vivo. Los ratones hembra C3h7HeJ fueron comprados a Jackson Laboratories. Los animales se dosificaron conforme con el diseño experimental de la tabla 4. Los animales se inyectaron i.p. (100 ul/ratón) 15 minutos posdosis con LPS en el momento cero. Los animales se sometieron a eutanasia 2 y 4 horas después de la inyección de LPS por sobredosis de CO2 y se recolectó la sangre por punción cardíaca. Se transfirió la sangre a microtubos separadores de suero y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugaron los microtubos a 12.000 rpm durante 5 minutos y se retiró el suero y se fraccionó en una placa de 96 cavidades. Se usó ácido rosmarínico como un control positivo y se usó como 3 mg/ml en solución salina. La placa de 96 cavidades se congeló a –20 °C. Se analizaron las muestras de suero en cuanto al contenido de C5a por DuoSet. Se determinó la significancia estadística con software de generación de gráficos Prims y los efectos se consideraron estadísticamente significativos si p < 0,05. Como se ilustra en la Figura 10, SEQ ID NO:1 (UTI–Fc1) redujo significativamente C5a a 20, 50 y 100 mg/kg a 4 horas después de la dosis de LPS.

TABLA 4: Diseño experimental (UTI–Fc1 es SEQ ID:1)

Grupo	Descripción	Dosis (mg/kg)	Conc. (mg/ml)	Volumen (ml/kg)Vía		Estimulación LPS (i.p)	LPS conc. (mg/ml)	Animales
1	Sin tratamiento							8
2	Veh –2 hr	—	—	10	iv	30 ug	0,3	8
3	UTI–Fc1 –2 hr	50	5,0	10	iv	30 ug	0,3	8
4	Ros_2 hr_30mpk	30	3,0	10	sc	30 ug	0,3	8
5	Veh – 4 hr	—	—	10	iv	30 ug	0,3	8
6	UTI–Fc1 –4 hr_5mpk	5	0,5	10	iv	30 ug	0,3	8
7	UTI–Fc1 –4	20	2,0	10	iv	30 ug	0,3	8

	hr_20mpk							
8	UTI-Fc1 -4 hr_50mpk	50	5,0	10	iv	30 ug	0,3	8
9	UTI-Fc1 -4 hr_100mpk	100	10,0	10	iv	30 ug	0,3	8
10	Ros_4 hr_30mpk	30	3,0	10	sc	30 ug	0,3	8

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 Secuencia proteica de UTI-Fc 1

AVLPQEEEGSGGGQLVTEVTKKEDSCQLGYSAGPCMGMTSRYFYNGTSMACETF
QYGGCMGNNGNNFVTEKECLQTCRTVAACNLPIVRGPCRAFIQLWAFDAVKGKCVLF
PYGGCQGNNGNKFYSEKECREYCGVPGDGDEELLGSGGGGDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:2 Secuencia de ADN de UTI-Fc 1

GCTGTGCTGCCTCAGGAAGAGGAAGGCTCTGGCGGAGGCCAGCTCGTGACCGA
AGTGACCAAGAAAGAGGACTCCTGCCAGCTGGGCTACTCTGCCGGCCCTTGTAT
GGGCATGACCTCCCGGTACTTCTACAACGGCACCTCCATGGCCTGCGAGACATT
CCAGTACGGCGGCTGCATGGGCAACGGCAACAACCTTTGTGACAGAGAAAGAGT
GCCTGCAGACCTGCAGAACCGTGGCCGCCTGTAACCTGCCTATCGTGCGGGGA
CCCTGTGCGGGCCTTTATCCAGCTGTGGGCCTTCGACGCCGTGAAGGGCAAATG
CGTGCTGTTCCCCTATGGCGGCTGCCAGGGAAATGGAAACAAGTTCTACTCCGA
GAAAGAATGCCGCGAGTACTGTGGCGTGCCAGGCGACGGGGATGAGGAACTGC
TGGGATCAGGCGGCGGAGGCGACAAGACCCATACCTGTCCACCTTGCCCTGCC
CCCGAGCTGCTGGGAGGACCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGA
CACCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGT
CCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG
CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGT
GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA
AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCA
AGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCG
GGAAGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGATTCTA
CCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCT
ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCA
AGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAG
CCCCGGC

SEQ ID NO:3 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfngtsmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtc
rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpdyggcggngnkfysekecreycgvpgdgdeellrepkssdkthtcp
pcpapellggssvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvl
tvlhqdwlngkeykckvsnkalsiekiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlcvkgfypsdiavewesng
qpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:4 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser

gtctgtctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaagaggactcc
tgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccgggtacttctacaacggcacctccatggcctgcga
gacattccagtacggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgacctgcagacctgcaga
accgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaa
gggcaaattgctgtctgttcccctatggcggctgccagggaaatggaaacaagttctactccgagaaagaatgccgcg
agtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgtcgcgggagcccaaattctccgacaagaccatactg
tccacctgcccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatga
tctcccggaaccctgaagtgacctgctggtggtggatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgt
ggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt
ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcct
gcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctagc
cgggaagagatgacaaagaaccagggtgcctgacctgtctcgtgaagggtattctaccctccgatatcgccgtgga
atgggagtgccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacggctcatttctct
gtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccct
gcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:5 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG2 Ser

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfyngtmacetfgyggcmgngnnfvtekeclqtc
rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfp yg gcqgngnkfysekecreycgvpgdgdeellrksvecppcpa
ppvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvdvshedpevqfnwyvdgmevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvh
qdwlngkeykckvsnkglpapiektisktgqpprepqvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesnggqe
nnyktpmldsdgsfflyskltvdksrwgggnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk

SEQ ID NO:6 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG2 Ser

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaagaggactcc
tgccagctgggctactctgccggcccttgatatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcga
gacattccagtacggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgacctgcagacctgcaga
accgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaa
gggcaaatacgctgctgttcccctatggcggctgccagggaaatggaaacaagttctactccgagaaagaatgccgcg
agtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgtgcggaaatcctgtgtcgagtgccaccgtgcccagc
accacctgtggcaggaccgtcagttctctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctga
ggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcatggag
gtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggctcagcgtcctaccgtcgt
gcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgaga
aaaccatctccaaaaccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgaggaggatg

accaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagca
atgggcagccgggagaacaactacaagaccacacctcccattgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca
ctacacacagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

SEQ ID NO:7 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG2

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfqyggcmgngnnfvtekeclqtc
rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkyfysekecreycgvpdgddeellrkccvecppcpa
ppvagpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgmevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvh
qdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpe
nnykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg

SEQ ID NO:8 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG2

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaagaggactcc
tgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcga
gacattccagtagcggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcaga
accgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaa
gggcaaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaagttctactccgagaaagaatgccgcg
agtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcggaaatgttgtgtagtgcccaccgtgccagca
ccacctgtggcaggaccgtcagttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgag
gtcacgtgcgtgggtggtagctgagccacgaagaccccagggtccagttcaactggtagtgacggcatggaggt
gcataatgcaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtagcgtcctcaccgtcgtgc
accaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccagccccatcgagaaa
accatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgac
caagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat
gggcagccgggagaacaactacaagaccacacctcccattgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagct
caccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact
acacacagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

SEQ ID NO:9 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser S10A

avlpqeeegagggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfqyggcmgngnnfvtekeclqtc
rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkyfysekecreycgvpdgddeellrepkssdkthtcp
pcpapellggssvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvl
tvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesng
qpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg

SEQ ID NO:10 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser S10A

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggcgcaggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaagaggactc
ctgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcg
agacattccagtagcggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcag
aaccgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtga
agggcaaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaagttctactccgagaaagaatgccgc

gagtagctgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggagcccaaattcttcgacaagaccatacct
gtccacctgtccctgccccgagctgctgaggatcctctgtgttctgttcccccaaagcccaaggacacctgatg
atctcccggaacctgaagtgacctgctggtggtggatgtgtccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacg
tggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtg
tccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcc
tgctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctag
ccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggattctacccctccgatatgccgtgga
atgggagttcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacggctcatttctct
gtactccaagctgacagtggacaagtcccgtggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccct
gcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:11 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser m2

edscqlgysagpcmgmtsryfngtsmacetfgyggcmgnngnfvtekeclqtcrvaacnlpivrgpcrafiqlwaf
davkgkcvlfpyggcgngnkfysekecreycgvpgdgdeellrepkssdkthtccppcapellggssvflfppkpkd
tlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnka
lpasiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttpvldsdsffly
skltvdksrwqggnvfscsvmhealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:12 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser m2

gaggactcctgccagctgggctactctgccggccctgtatgggcatgacctccgggtacttctacaacggcacctccat
ggcctgcgagacattccagtacggcgggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcag
acctgcagaaccgtggccgcctgtaacctgcctatcgctgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcga
cgccgtgaagggcaaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaaatggaaacaagtctactccgagaaaag
aatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggagcccaaacttccgacaaga
cccataacctgtccaccttgccctgcccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttccccccaaagcccaaggac
acctgatgatctcccggaacctgaagtacctgcgtggtggtggtatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagtca
attggtacgtggacggcgtggaagtcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctacc
gggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaagggtgtccaacaag
gccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaaggggccagccccgggaaccccagggtgtacacactg
ccccctagccgggaagagatgacaaagaaccagggtgtccctgacctgtctcgtgaagggaattctacccctccgatatc
gccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacgggt
catttctctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcac
gaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:13 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser m1

avlpqeeegsgggqlvtevtkkekpkssdkthtccppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpe
vkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakggpprepqvytl
ppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmh
ealhnhytqkslsispq

SEQ ID NO:14 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser m1

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaagagcccaa
 atcttccgacaagaccatacctgtccacctgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttcctgttcccccc
 aaagcccaaggacaccctgatgatctccggaccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtccacgaggatc
 ccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagt
 acaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgc
 aaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgggaaccc
 caggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggatt
 ctaccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtg
 ctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggcaacgtgttct
 cctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:15 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser link3

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfngtsmacetfqyggcmgnngnnfvtekeclqtc
 rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkyfysekecreycgvpdgddeellggggsggggse
 pkssdkthtccppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpree
 qynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgpprepqvytlppsreemtknqvsltlvkgyfyp
 sdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslsisp

SEQ ID NO:16 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser link3

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaagaggactcc
 tgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcga
 gacattccagtacggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcaga
 accgtggccgctgtaacctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaa
 gggcaaatgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaagttctactccgagaaagaatgccgcg
 agtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgggagggtggtggatcaggtggcggaggatcagagc
 ccaaatcttccgacaagaccatacctgtccacctgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttcctgttcc
 ccccaaagcccaaggacaccctgatgatctccggaccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtccacgag
 gatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaa
 cagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaa
 gtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccggga
 accccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaag
 ggattctaccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccaccccc
 ctgtgctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggcaacgt
 gttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:17 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser link2

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfngtsmacetfqyggcmgnngnnfvtekeclqtc
 rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkyfysekecreycgvpdgddeellrcppcpapellgg
 ssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlng
 keykckvsnkalpasiektiskakgpprepqvytlppsreemtknqvsltlvkgyfypsdiavewesngqpennyktt
 ppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslsisp

SEQ ID NO:18 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser link2

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaaggactcc
 tgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcga
 gacattccagtacggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgctgcagacctgcaga
 accgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaa
 gggcaaatgctgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaagtctactccgagaaagaatgccgcg
 agtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggtgccacctgccctgcccccgagctgctggga
 ggatcctctgtgttctgttcccccaagcccaaggacaccctgatgatctcccgaccctgaagtgacctgcgtggt
 ggtggatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaag
 accaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggattggct
 gaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggc
 caagggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccagggtgt
 ccctgacctgtctcgtgaagggattctacccctccgatatgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaaca
 actacaagaccacccccctgtgctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccg
 gtggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtc
 cctgagccccggc

SEQ ID NO:19 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser link1

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsrlyfngtmacetfqyggcmgnngnnfvtekeclqtc
 rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkyfsekecreycgvssvflfpkpkdtlmsrtpevtc
 vvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektisk
 akqqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflyskltvdksw
 qqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:20 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser link1

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaccaagaaaggactcc
 tgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcga
 gacattccagtacggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgctgcagacctgcaga
 accgtggccgcctgtaacctgcctatcgtgcggggaccctgtcgggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaa
 gggcaaatgctgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaagtctactccgagaaagaatgccgcg
 agtactgtggcgtgtcctctgtgttctgttcccccaagcccaaggacaccctgatgatctcccgaccctgaagtg
 acctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcac
 aacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcac
 caggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagacc
 atctccaaggccaagggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaa
 gaaccagggtgtccctgacctgtctcgtgaagggattctacccctccgatatgccgtggaatgggagtccaacggcca
 gcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagt
 gacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacca
 gaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:21 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser K21S K22S

avlpqeeegsgggqlvtevtssedscqlgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfqyggcmgnnnfvtekeclqtc
 rtvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcgngnkfysekecreycgvpgdgdeellrepkssdkthtcp
 pcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvl
 tvlhqdwlngkeykckvsnkalspasiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesng
 qpennykttpvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispg

SEQ ID NO:22 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser K21S K22S

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaacctcctccgaggactcctg
 ccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccgtacttctacaacggcacctccatggcctgcgag
 acattccagtagcgcggtgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcagaa
 ccgtggccgctgtaacctgcctatcgtagggggaccctgtcggggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaag
 ggcaaagtgcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaagtctactccgagaaagaatgccgcga
 gtactgtggcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggagcccaaacttccgacaagaccataacctgtc
 caccttgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaaagcccaaggacacctgatgatc
 tcccggaacctgaagtgaacctgcgtggtggtgatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtgg
 acggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtcc
 gtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaagggtgtccaacaaggccctgcctg
 cctcatcgaaaagaccatctccaaggccaaggggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctagcc
 gggaagagatgacaaagaaccagggtgtccctgacctgtctcgtgaagggtattctacccctccgatatcgccgtggaat
 gggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacgggtcattcttctgt
 actccaagctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctg
 cacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:23 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser d2

avlpqeeegsgggqlvtevtkktvaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcgngnkfysekecreycgv
 pgdgdeellrepkssdkthtcpcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvev
 hnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalspasiektiskakgqprepvytlppsreemtknqv
 sltlvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksls
 spg

SEQ ID NO:24 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser d2

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaaccaaaaaaccgtggcc
 gcctgtaacctgcctatcgtagggggaccctgtcggggcctttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggaat
 gcgtgctgttcccctatggcggctgccagggaatggaacaagtctactccgagaaagaatgccgcgagtactgtg
 gcgtgccaggcgacggggatgaggaactgctgcgggagcccaaacttccgacaagaccataacctgtccaccttg
 ccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttctgttcccccaaagcccaaggacacctgatgatctccgg
 accctgaagtgaacctgcgtggtggtgatgtgtcccacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggc
 gtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctg
 accgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgaagggtgtccaacaaggccctgcctgcctcat
 cgaaaagaccatctccaaggccaaggggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctagccgggaag
 agatgacaaagaaccagggtgtccctgacctgtctcgtgaagggtattctacccctccgatatcgccgtggaatgggagt
 ccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactccgacgggtcattcttctgtactcca

agctgacagtggacaagtcccgggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaac
cactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:25 Secuencia proteica de UTI-Fc IgG1 3Ser d1

avlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfqyggcmgnngnnfvtekeclqtc
repkssdkthtcppcpapellggssvflfpkpkdltlmisrteptcvvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpr
eeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlclvkf
ypsdiawesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspg

SEQ ID NO:26 Secuencia de ADN de UTI-Fc IgG1 3Ser d1

gctgtgctgcctcaggaagaggaaggctctggcggaggccagctcgtgaccgaagtaccaagaagaggactcc
tgccagctgggctactctgccggcccttgatgggcatgacctcccggctacttctacaacggcacctccatggcctgcga
gacattccagtacggcggctgcatgggcaacggcaacaactttgtgacagagaaagagtgcctgcagacctgcaga
gagcccaaatctccgacaagaccatacctgtccacctgacctgcccccgagctgctgggaggatcctctgtgttcct
gttcccccaagcccaaggacacctgatgatctccggaccttgaagtgacctgctggtggtggatgtgtccca
cgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagcccagaga
ggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgacctgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagt
acaagtgaaggtgtccaacaaggccctgctgctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcccc
gggaaccccagggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccagggtgtccctgacctgtctcgt
gaagggattctaccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacc
ccccctgtgtggactccgacggctattcttctgtactccaagctgacagtgagacaagtcccggtggcagcagggca
acgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagccccggc

SEQ ID NO:27 Secuencia proteica de mUTI-mFc mIgG1

avlpqesegsgteplitgtlkkedscqlnysegpcldgmqeryyyngasmacetfqyggclngnnfisekdclqtcrtia
acnlpivqgpcrafiklwafdaaagkciqfhyggckgngnkfysekeckeycgvpdgyeelirskivprdcgckpcic
tvpvssvflfpkpkdvltitltpkvtcvvvdiskddpevqfswfvdddevhtaqtqpreeqfnstfrsvselpimhqdw
ngkefkcrvnsaafpapiektisktkgrpkapqvytipppkeqmakdkvsltcmidffpeditvewqwnqpaenyk
ntqpimtdtdgsyfvysklnvqksnweagntftcsvlheglhnhhtekslshspgk

SEQ ID NO:28 Secuencia de ADN de mUTI-mFc mIgG1

gcagtgtgccccaaagagagtgaggggtcagggactgagccactaataactgggacctcaagaaagaagactcc
tgccagctcaattactcagaaggccccctgcctagggatgcaagagaggtattactacaacggcgcttccatggcctgc
gagaccttcaatatgggggtgcctaggcaacggcaacaacttcatctgagaaggactgtctgcagacatgtcgga
ccatagcggcctgcaatctccccatagtccaaggccccctgccgagccttcataaagctctgggcatttgatgcagcaca
agggaagtgcaccaattccactacgggggtgcaaaggcaacggcaacaaatttactctgagaaggaatgcaaa
gagtactgtggagtccctggtgatgggtacgaggaactaacgcagtaaaatcgtgcctcgggactgagggtgcaa
gccctgcatctgcaccgtgcccagggtgtcctccgtgttcatcttccaccaagcccaaggacgtgctgacctacc
ctgacccccaaagtacctgctggtggtggacatctccaaggacgaccccgagggtgcagttcagttggttcgtggac
gacgtggaagtgcacaccgcccagaccagcccagagaggaacagttcaactccacctcagatccgtgtccgagc
tgccatcatgcaccaggactggctgaacggcaaagagttcaagtgcagagtgaactccgccgccttccagcccc
atcgaaaagaccatctccaagaccaagggcagaccaaggccccccagggtgtacaccatccccccacccaaaga

acagatggccaaggacaaggtgtccctgacctgcatgatcaccgatttctcccagaggacatcaccgtggaatggca
gtggaacggccagcccgccgagaactacaagaacacccagcccatcatggacaccgacggctcctacttcgtgtac
tccaagctgaacgtgcagaagtccaactgggaggccggcaacaccttcacctgtagcgtgctgcacgagggcctgc
acaaccaccacaccgagaagtcctgtcccactccccggcaag

SEQ ID NO:29 Secuencia proteica de Fc IgG1 3Ser UTI

epkssdkthtcppcpapellggssvflfppkpkdtlmisrtpvctvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpre
eqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpasiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgyf
psdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgkggg
gsgggsggggsavlpqeeegsgggqlvtevtkkedscqlgysagpcmgmtsryfyngtsmacetfqyggcmgn
gnnfvtekeclqtcrtaacnlpivrgpcrafiqlwafdavkgkcvlfpyggcqqngnkfysekecreycgvpgdgdeel
lr

SEQ ID NO:30 Secuencia de ADN del Fc IgG1 3Ser UTI

gagcccaaatctccgacaagaccatacctgtccacctgccctgccccgagctgctgggaggatcctctgtgttct
gttcccccaagcccaaggacaccctgatgatctccggaccctgaagtgacctgcgtggtggtgatgtgtcca
cgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagcccagaga
ggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagt
acaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgcctccatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcccc
gggaaccccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatgacaaagaaccagggtgtccctgacctgtctcgt
gaagggattctaccctccgatatcgccgtggaatgggagtgcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacc
ccccctgtgtggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggaacagtcctggcagcagggca
acgtgttctcctgtcctgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtccctgagccccggca
agggaggtggtggatcaggaggtggaggttccgggtggcggaggatcagctgtgctgcctcaggaagaggaaggctc
tggcggaggccagctcgtgaccgaagtgaacaaagaggactcctgccagctgggctactctgccggcccttgta
tgggcatgacctcccggtacttctacaacggcacctccatggcctgcgagacattccagtagcggcgtgcattgggca
acggcaacaactttgtgacagagaaagagtgctgcagacctgcagaaccgtggccgcctgtaacctgcctatcgtg
cggggacctgtcgggccttatccagctgtgggccttcgacgccgtgaagggcaaatgcgtgctgttcccctatggcg
gctgccagggaaatggaaacaagttctactccgagaaagaatgccgcgagtactgtggcgtgccaggcgacgggg
atgaggaactgctgcgg

SEQ ID NO:31 Secuencia proteica de hUTI

avlpq eeegsgggql vtevtkkeds cqlgysagpc
mgmtsryfyn gtsmacetfq yggcmngnngn ftekeclqt crtvaacnlp ivrgpcrafi
qlwafdavkg kcvlfpyggc qqngnkfyse kecreycgvp gdgdeellrf sn

SEQ ID NO:32 Secuencia proteica de AMBP

mrslgallll Isaclavsag pvptppdniq vqenfnisri ygkwynlaig stcpwlkkim
drmtvstlvi gegateaeis mtstrwrkgv ceetsgayek ttdgkflyh kskwnitmes
yvvhntydey aifltkkfsr hhgptitaki ygrapqlret llqdfrrvaq gvgipedsif
tmadrgecvp geqepepili prvravlpq eeegsgggql vtevtkkeds cqlgysagpc
mgmtsryfyn gtsmacetfq yggcmngnngn ftekeclqt crtvaacnlp ivrgpcrafi
qlwafdavkg kcvlfpyggc qqngnkfyse kecreycgvp gdgdeellrf sn

SEQ ID NO:33
SGGGGS

SEQ ID NO:34
SGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 35
SGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:36
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:37
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:38
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:39
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:40
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:41
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO:42
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GS

SEQ ID NO:43
GSGGGSGGGGSGGGGS