

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión, que comprende:
 - un primer polipéptido o proteína capaz de translocarse a un retículo endoplasmático (ER) o un fragmento de estos; y
 - una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18,
 - en donde la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, está en el extremo C-terminal de la proteína de fusión con relación al primer polipéptido o proteína capaz de translocarse al ER.
2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende las posiciones de aminoácidos 37-193 de la SEQ ID NO:250 con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96 y M149 de la SEQ ID NO:250.
3. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende las posiciones 37-193 de la SEQ ID NO:251 con una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones C74, C104, C112 y C164 y una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96 y M149 de la SEQ ID NO:251
4. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las sustituciones de aminoácidos en una o más de C74, C104, C112 y C164 son cada una independientemente por valina, alanina o serina.
5. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende las posiciones 37-193 de la SEQ ID NO:251 con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96 y M149 de la SEQ ID NO:251

6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde las uno a cinco sustituciones de aminoácidos son una o más de:
 - E42K, E42R, E42A, E42H o E42Q;
 - M87K o M87H;
 - K89G, K89A o K89E;
 - M96L o M96I; o
 - M149V o M149I.
7. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde las una a cinco sustituciones de aminoácidos son
 - E42K, E42R, E42A, E42H o E42Q;
 - M87K o M87H;
 - K89G, K89A o K89E;
 - M96L o M96I; y
 - M149V o M149I.
8. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, comprende además su propéptido (PP) o una variante de PP.
9. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la variante de propéptido de IL-18 comprende un polipéptido que tiene AAEPVEDNX₁INFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN (SEQ ID NO:238), en donde X₁ es cualquier aminoácido excepto cisteína.
10. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 9, en donde X₁ es alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptófano (SEQ ID NO:239).
11. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la proteína de fusión no comprende un polipéptido que consiste de la secuencia X₁-X₂-X₃-X₄ entre el propéptido o variante de propéptido, y la IL-18 madura o variante de IL-18 madura, en donde

X_1 es L o está ausente,

X_2 es E o está ausente,

X_3 es S o está ausente, y

X_4 es D o está ausente, y cuando X_1 , X_2 , X_3 , y X_4 están presentes, el polipéptido que consiste de la secuencia X_1 - X_2 - X_3 - X_4 es LESD (SEQ ID NO:253).

12. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el PP o la variante de PP está en el extremo N-terminal con relación a la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18.
13. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde el PP o la variante de PP sirve como un dominio de enmascaramiento.
14. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además uno o más sitios de escisión por proteasa.
15. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el uno o más sitios de escisión por proteasa están
 - entre la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y la primera proteína capaz de translocarse a un retículo endoplasmático (ER) o fragmento de esta, o
 - dentro del PP, entre el PP o la variante de PP y la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, o
 - dentro del PP, entre el PP o la variante de PP, y la primera proteína capaz de translocarse a un retículo endoplasmático (ER) o fragmento de esta, o
 - dentro de la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, o dentro del PP, o
 - una de sus combinaciones.
16. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además una segunda proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta, en donde la segunda proteína capaz de translocarse al ER está en el extremo C-terminal con relación

- a la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18.
17. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende además un sitio de escisión por proteasa entre la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y la segunda proteína capaz de translocarse a un retículo endoplasmático (ER) o fragmento de esta.
 18. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, se fusiona al extremo C-terminal de la primera proteína capaz de translocarse al ER.
 19. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en donde la segunda proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta se fusiona al extremo C-terminal de la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18.
 20. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la variante de IL-18 tiene una unión disminuida a la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), en comparación con una IL-18 de tipo salvaje (wt).
 21. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la variante de IL-18 tiene una afinidad de unión al receptor de la IL-18 humana (IL-18R) dentro de 30 veces de la IL-18 de tipo salvaje.
 22. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la relación de afinidad de unión de la proteína de fusión que comprende la variante de IL-18 a la IL-18BP: afinidad de unión de la proteína de fusión que comprende la variante de IL-18 al IL-18R no es mayor de 3:1.
 23. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la primera proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta es una proteína globular,

proteína inmunoglobular, o un fragmento de esta, o es un polipéptido o proteína cortos modificados genéticamente con un péptido señal para translocarse al ER, opcionalmente el polipéptido o proteína cortos es de aproximadamente 2kDa o no mayor de 250 kDa.

24. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la primera proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta se selecciona del grupo que consiste en una región de fragmento cristizable (Fc), albúmina sérica humana (HSA), beta2microglobulina, transferrina, región de fragmento de unión a antígeno (región Fab), anticuerpo VHH, fragmento variable de cadena simple (scFv), anticalina, proteína de repetición de anquirinas diseñada (DARPin), un dominio de unión de estas, y un fragmento de estas.
25. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la primera proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta de la proteína de fusión, es una proteína transmembrana de tipo I o un fragmento de esta o una proteína transmembrana de tipo II o un fragmento de esta.
26. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 16-25, en donde la segunda proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta es una proteína globular, proteína inmunoglobular, o un fragmento de esta, o es un polipéptido o proteína cortos modificados genéticamente con un péptido señal para translocarse al ER, opcionalmente el polipéptido o proteína cortos es de aproximadamente 2kDa o no mayor de 250 kDa.
27. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 16-26, en donde la segunda proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta se selecciona del grupo que consiste en una región de fragmento cristizable (Fc), albúmina sérica humana (HSA), beta2microglobulina, transferrina, región de fragmento de unión a antígeno (región Fab), anticuerpo VHH, fragmento variable de cadena simple (scFv), anticalina, proteína de repetición de anquirinas diseñada (DARPin), un dominio de unión de estas, y un fragmento de estas.

28. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 16-26, en donde la segunda proteína capaz de translocarse al ER o un fragmento de esta de la proteína de fusión, es una proteína transmembrana de tipo I o un fragmento de esta, o una proteína transmembrana de tipo II o un fragmento de esta.
29. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 24 y 27, en donde la región Fc es una región Fc de IgA, IgM, IgG o IgE.
30. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 24 y 27, en donde la región Fc es una región Fc de IgG4, KiH o IgG1.
31. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 24 y 27, en donde la región Fc es una región Fc de botón en ojal, HA-TF, Xmab, ZW1, 7.8.60, orientación por interacción electrostática, DD-KK, EW-RVT, A107, o Duocuerpo.
32. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde se modifican una o más cisteínas en la proteína de fusión.
33. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde una o más cisteínas en la proteína de fusión se reemplazan con un aminoácido natural o no natural.
34. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde una o más cisteínas en la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18 de la proteína de fusión, se modifican o se reemplazan con un aminoácido natural o no natural.
35. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 8-34, en donde una o más cisteínas en el PP o la variante de PP de la proteína de fusión, se modifican o se reemplazan con un aminoácido natural o no natural.
36. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 33-35, en donde el aminoácido natural se selecciona cada uno independientemente de serina y valina.

37. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 33-35, en donde el aminoácido natural se selecciona cada uno independientemente de treonina, asparagina y glutamina.
38. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 17-37, en donde la proteasa se selecciona del grupo que consiste en EK, TEV, Adam17, cathepsina, MMP2, MMP9, MMP14, granzima A, granzima B, granzima M, granzima K, y sus combinaciones.
39. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-38, que tiene una o más secuencias como se expone en una cualquiera de las Tablas 1 y 4.
40. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene el polipéptido 1 y el polipéptido 2, y opcionalmente el polipéptido 3 seleccionados de la Tabla 1.
41. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene el polipéptido 1 y el polipéptido 2, y opcionalmente el polipéptido 3 seleccionados de la Tabla 1, en donde el polipéptido 1 y el polipéptido 2, y opcionalmente el polipéptido 3, se seleccionan de la misma hilera de la Tabla 1.
42. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene el polipéptido 1 seleccionado de la Tabla 1, en donde el polipéptido 1 comprende HSA.
43. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-42, en donde la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la columna de IL-18 madura en la Tabla 1.
44. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 8-42, en donde la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la columna de IL-18 madura en la Tabla 1, y el propéptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la columna de Propéptido en la Tabla 1, opcionalmente la misma de la misma hilera.

45. Una variante de propéptido de IL-18 que comprende un polipéptido que tiene AAEPVEDNX₁INFVAMKFIDENTLYFIAEDDEN, en donde X₁ es cualquier aminoácido excepto cisteína (SEQ ID NO:238).
46. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-44, o una variante de propéptido de IL-18 de acuerdo con la reivindicación 45.
47. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 46, en donde la primera proteína capaz de translocarse al ER está codificada por un polinucleótido que tiene una o más secuencias como se expone en la Tabla 2.
48. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 46, que tiene una o más secuencias de la misma hilera como se expone en la Tabla 2.
49. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 46-48.
50. Una célula transfectada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 49.
51. Un método para producir una proteína de fusión, que comprende:
cultivar una célula transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 49, en un medio de cultivo celular para permitir que la proteína de fusión se secrete al medio de cultivo celular.
52. El método de la reivindicación 51, en donde la proteína de fusión se produce a más de 135 mg/l bajo transfección transitoria en células CHO o células HEK-293.
53. Un método para producir interleucina 18 (IL-18), un fragmento de esta, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, que comprende:

cultivar una célula transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 49, en un medio de cultivo celular para permitir que una proteína de fusión se produzca y secrete al espacio extracelular; y

poner en contacto una proteasa con la proteína de fusión para escindir la proteína de fusión para producir la IL-18, el fragmento de esta, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18.

54. El método de la reivindicación 53, que comprende además aislar la proteína de fusión del medio de cultivo.
55. El método de la reivindicación 54, que comprende además purificar la proteína de fusión.
56. El método de la reivindicación 53, en donde la proteasa se selecciona del grupo que consiste en EK, TEV, Adam17, catepsina, MMP2, MMP9, MMP14, granzima A, granzima B, granzima M, y sus combinaciones.
57. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 53-56, en donde la IL-18, el fragmento de esta, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, se produce a más de 135 mg/l.