

VARIANTE DE IdeZ

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una variante de IdeZ y a un polipéptido y similares que comprenden la variante de IdeZ.

Antecedentes de la invención

IdeS derivada de *Streptococcus* es una cisteína proteasa que escinde de forma específica una bisagra que conecta Fab y Fc de la IgG humana. Esta enzima tiene una alta eficiencia de escisión y especificidad de sustrato y, como tal, se utiliza en la caracterización de candidatos a fármacos de anticuerpos y similares. En los últimos años, su uso se ha ampliado y, por ejemplo, se espera su uso en sistemas de producción de proteínas recombinantes de alta calidad y efectos sobre el rechazo en trasplantes, enfermedades autoinmunes y similares (Literatura no relacionada con patentes 1 y 2). Además, también se están investigando los productos de fusión de IdeS y una región Fc humana (Literatura no relacionada con patentes 1).

Sin embargo, la alta antigenicidad de IdeS puede volverse problemática de tal manera que los humanos que tienen antecedentes de infección por *Streptococcus* tienen inmunidad contra IdeS y dichos humanos producen un anticuerpo antifármaco (ADA) tras la administración de IdeS (Literatura no relacionada con patentes 3). Para resolver estos problemas con IdeS, también se están realizando investigaciones sobre IdeZ derivado de un *Streptococcus* que no infecta a los humanos, y sobre variantes de IdeZ que tienen variaciones que reducen la producción de ADA, y similares (Literatura de patente 1 y 2). Existe una demanda de mejoras adicionales en las características de dicha IdeZ o variantes de IdeZ.

Lista de citas

Literatura de patente

Literatura de patente 1: Publicación internacional núm. WO 2020/159970

Literatura de patente 2: Publicación internacional núm. WO 2021/233911

Literatura no relacionada con patentes

Literatura no relacionada con patentes 1: Primera Conferencia Académica en Conmemoración del Establecimiento de la Sociedad de Anticuerpos de Japón, noviembre de 2022, pág. 74

Literatura no relacionada con patentes 2: Drugs, Oct. 2020, Vol. 80, págs. 1859-1864

Literatura no relacionada con patentes 3: Am J Transplant, Nov. 2018, Vol. 18 (11), págs. 2752-2762

Breve descripción de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios diligentes para obtener una cisteína proteasa de IgG que tenga características mucho mejores y en el curso de los mismos, han descubierto que un

problema en la producción de IdeZ de tipo silvestre utilizando células de mamíferos (por ejemplo, células CHO) es la atenuación de la actividad de proteasa. Un objeto de la presente invención es proporcionar una variante de IdeZ que tenga una actividad de proteasa favorable incluso cuando se produzca utilizando células de mamíferos, y un polipéptido y similares que comprendan la variante de IdeZ.

Solución al problema

Para abordar el objetivo mencionado anteriormente, los presentes inventores han llevado a cabo estudios diligentes adicionales y, en consecuencia, han descubierto que se puede obtener una actividad de proteasa favorable mediante una variación de aminoácidos en una posición específica (por ejemplo, la secuencia consenso de una cadena de azúcar unida a N) de IdeZ, incluso cuando la IdeZ se produce utilizando células de mamíferos.

La presente invención es, por ejemplo, la siguiente.

[1] Una variante de IdeZ que tiene actividad de cisteína proteasa de IgG, la variante

(a) comprende una secuencia 90 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de las posiciones 35 a 349 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1; y

(b) tiene aminoácidos no glicosilados en una posición correspondiente a la posición 118 y una posición correspondiente a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

[2] La variante de IdeZ de acuerdo con [1], en donde la variante de IdeZ comprende las siguientes variaciones de aminoácidos (b') y (b''):

(b')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 118 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

(ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 120 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano; y

(b'')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

(ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 268 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 269 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano.

5 [3] La variante de IdeZ de acuerdo con [2], en donde en la variante de IdeZ, un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 120 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por ácido glutámico y un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 269 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por arginina.

[4] La variante de IdeZ de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], en donde la variante de IdeZ tiene
10 (c) un aminoácido no glicosilado en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, y/o (d) un aminoácido no glicosilado en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

[5] La variante de IdeZ de acuerdo con [4], en donde la variante de IdeZ comprende las siguientes variaciones de aminoácidos (c') y/o (d'):

15 (c')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

20 (ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 172 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 173 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

(d')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

30 (ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 299 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 300 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano.

[6] La variante de IdeZ de acuerdo con [5], en donde en la variante de IdeZ, un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:

1 se sustituye por glicina y/o un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 está sustituido por ácido aspártico.

[7] La variante de IdeZ de acuerdo con [6], en donde

en la variante de IdeZ,

un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 120 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 está sustituido por ácido glutámico,

un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por glicina,

un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 269 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por arginina, y

un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 está sustituido por ácido aspártico.

[8] La variante de IdeZ de acuerdo con [7], en donde la variante de IdeZ comprende una secuencia de aminoácidos 90 % o más idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5.

[9] Un polipéptido que comprende la variante de IdeZ de acuerdo con cualquiera de [1] a [8].

[10] El polipéptido de acuerdo con [9], en donde el polipéptido es una proteína de fusión de la variante de IdeZ y una región Fc.

[11] El polipéptido de acuerdo con [10], en donde la región Fc se deriva de IgG humana.

[12] El polipéptido de acuerdo con [11], en donde la región Fc se deriva de Igγ1 humana, Igγ2 humana, Igγ3 humana o Igγ4 humana.

[13] El polipéptido de acuerdo con cualquiera de [10] a [12], en donde en la región Fc,

el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico, y

el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,

en donde los números de residuos de aminoácidos son posiciones de aminoácidos de acuerdo con el índice de la UE.

[14] El polipéptido de acuerdo con [13], en donde en la región Fc, además,

el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina, y

el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico.

[15] El polipéptido de acuerdo con [14], en donde en la región Fc, además,

el residuo de aminoácido 227 se sustituye por histidina,

el residuo de aminoácido 228 se sustituye por lisina,

el residuo de aminoácido 233 se sustituye por asparagina, y/o

el residuo de aminoácido 238 se sustituye por serina.

[16] El polipéptido de acuerdo con [14] o [15], en donde en la región Fc, además,

el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina,
 el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina, y/o
 el residuo de aminoácido 296 se sustituye por alanina.

[17] El polipéptido de acuerdo con [16], en donde la región Fc se selecciona entre las
 5 siguientes regiones Fc (1) y (2):

(1)

una región Fc en la que
 el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina,
 el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico,
 10 el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico,
 el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,
 el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina, y
 el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina; y

(2)

15 una región Fc en la que
 el residuo de aminoácido 227 se sustituye por histidina,
 el residuo de aminoácido 228 se sustituye por lisina,
 el residuo de aminoácido 233 se sustituye por asparagina,
 el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina,
 20 el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico,
 el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico,
 el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,
 el residuo de aminoácido 238 se sustituye por serina,
 el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina, y
 25 el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina.

[18] El polipéptido de acuerdo con [17], en donde la región Fc comprende una secuencia
 de aminoácidos 90 % o más idéntica a una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316
 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16, una secuencia que consiste en
 aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:
 30 17, una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de
 aminoácidos representada por SEQ ID NO: 21, o una secuencia que consiste en aminoácidos en las
 posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 22.

[19] El polipéptido de acuerdo con cualquiera de [10] a [18], en donde la proteína de fusión
 es una proteína de fusión de la variante de IdeZ unida al extremo N de la región Fc, y dos de dichas
 35 proteínas de fusión forman un dímero.

[20] El polipéptido de acuerdo con cualquiera de [10] a [18], en donde el polipéptido
 comprende una proteína de fusión de la variante de IdeZ unida al extremo N de una primera región Fc y
 una segunda región Fc sin la variante de IdeZ ligada a ella.

[21] El polipéptido de acuerdo con [20], en donde la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden mutaciones de perillas en agujeros, y las mutaciones de perillas en agujeros son cualquiera de las siguientes mutaciones (1) y (2):

(1)

5 en la primera región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por triptófano, y en la segunda región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por serina, el residuo de aminoácido 368 está sustituido por alanina y el residuo de aminoácido 407 está sustituido por valina; y

(2)

10 en la primera región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por serina, el residuo de aminoácido 368 está sustituido por alanina y el residuo de aminoácido 407 está sustituido por valina; y en la segunda región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por triptófano.

[22] El polipéptido de acuerdo con cualquiera de [19] a [21], en donde la región Fc o la primera región Fc y la segunda región Fc están sialiladas.

[23] Un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con cualquiera de [9] a [22].

15 [24] Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [23].

[25] Una célula hospedera transformada con el vector de expresión de acuerdo con [24].

[26] Un método para producir un polipéptido que comprende una variante de IdeZ, el método comprende el paso de cultivar la célula hospedera de acuerdo con [25].

20 [27] El método de acuerdo con [26], que comprende además el paso de añadir o expresar β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1).

[28] Una variante de la región Fc en donde

el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico, y

el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,

25 en donde los números de residuos de aminoácidos son posiciones de aminoácidos de acuerdo con el índice de la UE.

[29] La variante de la región Fc de acuerdo con [28], en donde, además,

el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina, y

el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico.

30 [30] La variante de la región Fc de acuerdo con [29], que comprende además las siguientes variaciones de aminoácidos:

el residuo de aminoácido 227 se sustituye por histidina,

el residuo de aminoácido 228 se sustituye por lisina,

el residuo de aminoácido 233 se sustituye por asparagina, y/o

el residuo de aminoácido 238 se sustituye por serina.

35 [31] La variante de la región Fc de acuerdo con [29] o [30], que comprende además las siguientes variaciones de aminoácidos:

el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina,

el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina, y/o

el residuo de aminoácido 296 se sustituye por alanina.

[32] La variante de la región Fc de acuerdo con [31], en donde la variante de la región Fc se selecciona entre las siguientes variantes de la región Fc (1) y (2):

(1)

5 una variante de la región Fc en la que
 el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina,
 el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico,
 el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico,
 el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,
 10 el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina, y
 el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina; y

(2)

una variante de la región Fc en la que
 el residuo de aminoácido 227 se sustituye por histidina,
 15 el residuo de aminoácido 228 se sustituye por lisina,
 el residuo de aminoácido 233 se sustituye por asparagina,
 el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina,
 el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico,
 el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico,
 20 el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,
 el residuo de aminoácido 238 se sustituye por serina,
 el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina, y
 el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina.

[33] La variante de la región Fc de acuerdo con cualquiera de [28] a [32], en donde la
 25 región Fc se deriva de IgG humana.

[34] La variante de la región Fc de acuerdo con [33], en donde la región Fc se deriva de
 Igγ1 humana, Igγ2 humana, Igγ3 humana o Igγ4 humana.

[35] Un polipéptido que comprende la variante de la región Fc de acuerdo con cualquiera
 de [28] a [34] que no se escinde con la cisteína proteasa de IgG.

30 [36] Una proteína de fusión de la cisteína proteasa de IgG y la variante de la región Fc de
 acuerdo con cualquiera de [28] a [34].

[37] La proteína de fusión de acuerdo con [36], en donde la cisteína proteasa de IgG es
 IdeS, IdeZ, IdeZ2, IdeE, IdeE2, IdeP, IdeSORK o IgdE, o una variante de las mismas.

[38] La proteína de fusión de acuerdo con [37], en donde la proteína de fusión comprende
 35 una secuencia de aminoácidos 90 % o más idéntica a una secuencia que consiste en aminoácidos en las
 posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16, una secuencia
 que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada
 por SEQ ID NO: 17, una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la

secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 21, o una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 22.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención puede proporcionar una variante de IdeZ que tiene una actividad de proteasa favorable

incluso cuando se produce utilizando células de mamíferos y un polipéptido y similares que comprenden la variante IdeZ.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra el perfil electroforético de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 1 (diagrama de la izquierda: una condición no reductora, diagrama de la derecha: una condición reductora). El carril 5 representa un marcador de peso molecular, el carril 7 representa una proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón y el carril 9 representa una proteína de fusión IdeZ variante A-Fc de ratón.

La **Figura 2** muestra la actividad de escisión de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 1. La flecha 1 representa una cadena H. La flecha 2 representa un fragmento Fab'. Los carriles 3 a 7 representan los perfiles electroforéticos de un anticuerpo escindido con la proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón en proporciones de concentración de anticuerpos de 10, 33, 100, 333 y 1000 veces, respectivamente. Los carriles 8 a 12 representan los perfiles electroforéticos de un anticuerpo probado de la misma manera que el anterior utilizando la proteína de fusión variante A de IdeZ-Fc de ratón. El carril 13 representa el perfil electroforético únicamente de anti-KLH_hIgG1.

La **Figura 3** muestra el perfil electroforético de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 2 (diagrama de la izquierda: una condición no reductora, diagrama de la derecha: una condición reductora). El carril 5 representa una proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón, el carril 7 representa una proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón y el carril 9 representa una proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón.

La **Figura 4** muestra la actividad de escisión de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 2. La flecha 1 representa una cadena H. La flecha 2 representa un fragmento Fab'. Los carriles 3 a 7 del diagrama de la izquierda representan los perfiles electroforéticos de un anticuerpo escindido con la proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón en proporciones de concentración de anticuerpos de 10, 33, 100, 333 y 1000 veces, respectivamente. Los carriles 8 a 12 representan los perfiles electroforéticos de un anticuerpo probado de la misma manera que el anterior utilizando la proteína de fusión variante A de IdeZ-Fc de ratón. Los carriles 3 a 7 del diagrama derecho representan los perfiles electroforéticos de un anticuerpo probado de la misma manera que la anterior utilizando la proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón.

La **Figura 5** muestra el perfil electroforético de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 3-1 (diagrama de la izquierda: una condición reductora, diagrama de la derecha: una condición no reductora). El carril 1 representa un marcador de peso molecular, y los carriles 2 a 6 representan la variante A de IdeZ

sialilada-variante 5 de Fc humana, la variante A de IdeZ sialilada-variante 6 de Fc humana, la variante A de IdeZ sialilada-variante 9 de Fc humana, la variante A de IdeZ sialilada-variante 10 de Fc humana y la variante A de IdeZ sialilada-variante 11 de Fc humana, respectivamente.

La **Figura 6** muestra el perfil electroforético de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 3-2 (diagrama de la izquierda: una condición reductora, diagrama de la derecha: una condición no reductora). El carril 1 representa un marcador de peso molecular, y los carriles 2 a 5 representan las variantes 7, 8, 17 y 18 de la variante A IdeZ no sialilada-Fc humano, respectivamente. Los carriles 6 a 9 representan las variantes 7, 8, 17 y 18 de la variante A de IdeZ-Fc humano sialilado, respectivamente.

La **Figura 7** muestra el perfil electroforético de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 4 (diagrama de la izquierda: una condición reductora, diagrama de la derecha: una condición no reductora). El carril 1 representa un marcador de peso molecular, el carril 2 representa la variante A de IdeZ no sialilada-variante 19 de Fc humana, y el carril 3 representa la variante A de IdeZ sialilada-variante 19 de Fc humana.

La **Figura 8** muestra la actividad de escisión de cada proteína de fusión producida en el Ejemplo 5. Los carriles 2 a 5 representan los perfiles electroforéticos después de que la variante A de IdeZ sialilada-variante 7 de Fc humana reaccionara a concentraciones finales de 0.2, 0.04, 0.008 y 0.0016 veces, respectivamente, la cantidad de anti-KLH_hlgG1. Los carriles 8 a 11 representan los perfiles electroforéticos después de que la variante A de IdeZ sialilada-variante 19 de Fc humana reaccionara a concentraciones finales de 0.2, 0.04, 0.008 y 0.0016 veces, respectivamente, la cantidad de anti-KLH_hlgG1. Los carriles 1 y 14 representan cada uno un marcador de peso molecular, los carriles 7 y 13 representan cada uno el perfil electroforético de anti-KLH_hlgG1, el carril 6 representa el perfil electroforético de la variante A de IdeZ sialilada-variante 7 de Fc humana, el carril 12 representa el perfil electroforético de la variante A de IdeZ sialilada-variante 19 de Fc humana.

Descripción de las modalidades

A continuación, se describirá en detalle el modo de llevar a cabo la presente invención. Los materiales, configuraciones y similares descritos a continuación no limitan la presente invención, y se pueden realizar diversos cambios o modificaciones en la presente invención sin apartarse del espíritu de la presente invención.

1. Definiciones

Los términos de la presente especificación se utilizan en los significados generalmente empleados por los expertos en la materia, a menos que se especifique lo contrario.

Como se utiliza en este documento, el término "variante de IdeZ" significa IdeZ que comprende al menos una variación de aminoácidos en IdeZ de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), y la variación de aminoácidos incluye sustitución, adición, delección, inserción, modificación y similares de aminoácidos. Tal como se utiliza en este documento, la "variación" y la "mutación" de un aminoácido se utilizan indistintamente entre sí.

Como se utiliza en este documento, el término "variante de la región Fc" significa una región Fc que comprende al menos una variación de aminoácido en una región Fc de tipo silvestre, y la variación de aminoácido incluye sustitución, adición, delección, inserción, modificación de aminoácidos y similares. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "región Fc" o "variante de la región Fc" también incluye un complejo (por ejemplo, un dímero) compuesto por una pluralidad de regiones Fc.

Tal como se utiliza en este documento, la "región Fc (variante)" puede derivarse de cualquier anticuerpo. El anticuerpo (o inmunoglobulina) se refiere a una glicoproteína que tiene una estructura de cuatro cadenas que tiene una estructura en forma de Y bilateralmente simétrica compuesta por dos cadenas pesadas que tienen una sola secuencia y dos cadenas ligeras que tienen una sola secuencia. El anticuerpo tiene cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. La estructura básica de la molécula de anticuerpo es común entre estas clases, y dos cadenas pesadas que tienen un peso molecular de 50,000 a 70,000 y dos cadenas ligeras que tienen un peso molecular de 20,000 a 30,000 están unidas a través de un enlace disulfuro y un enlace no covalente para formar una molécula de anticuerpo que tiene una estructura de cuatro cadenas en forma de Y con un peso molecular de 150,000 a 190,000.

La cadena pesada consiste en una cadena polipeptídica que generalmente contiene aproximadamente 440 aminoácidos, tiene una estructura característica de cada clase y se designa como Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ e Ig ϵ , correspondientemente a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. La IgG también tiene subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y las cadenas pesadas correspondientes se denominan Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 e Ig γ 4, respectivamente. La cadena ligera consiste en una cadena polipeptídica que generalmente contiene aproximadamente 220 aminoácidos, y se sabe que tiene dos tipos, tipo L y tipo K, que se designan como Ig λ e Ig κ , respectivamente. Cada uno de estos dos tipos de cadenas ligeras se pueden combinar con cualquier tipo de cadena pesada.

En una molécula de anticuerpo, la cadena pesada tiene cuatro enlaces disulfuro intracadena (cinco en Ig μ e Ig ϵ) mientras que la cadena ligera tiene dos enlaces disulfuro intracadena y se forma un bucle cada 100 a 110 residuos de aminoácidos. Sus estructuras tridimensionales son similares entre los bucles y se designan como unidades estructurales o dominios. Tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera, un dominio ubicado en el extremo N se designa como una región variable, que tiene diversas secuencias de aminoácidos incluso entre anticuerpos producidos a partir de la misma clase (o subclase) de la misma especie de animales, y se sabe que participa en la unión específica anticuerpo-antígeno. Un dominio en el lado C-terminal corriente abajo de la región variable en el lado C-terminal tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente constante en cada clase o subclase, y se designa como una región constante. La cadena pesada tiene, en la dirección desde el extremo N hacia el extremo C, una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). El CH se divide además, desde el lado N-terminal, en tres dominios: un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3 (en el caso de IgG). La cadena ligera tiene, en la dirección desde el extremo N hacia el extremo C, una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL).

Las secuencias de aminoácidos de tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) presentes en VH y VL varían en gran medida y contribuyen a la variabilidad de las regiones variables. Las

CDR residen en el orden CDR1, CDR2 y CDR3 en el extremo N de cada una de las cadenas pesada y ligera, y estas regiones están compuestas de aproximadamente 5 a 10 residuos de aminoácidos y forman un sitio de unión al antígeno. Por otra parte, una porción excepto las CDR de la región variable se denomina regiones marco (FR), que consisten en FR1 a FR4 y varían comparativamente poco en la secuencia de aminoácidos.

Cuando un anticuerpo se trata con proteasa papaína, se obtienen tres fragmentos de anticuerpo. Dos fragmentos N-terminales se designan como regiones Fab (fragmento, unión a antígeno), y el fragmento C-terminal se designa como región Fc (fragmento, cristizable). Como se utiliza en este documento, la "región Fc" significa un polipéptido compuesto por una región constante de anticuerpo excepto el dominio CH1. Por lo tanto, las regiones Fc de IgA, IgD e IgG tienen los dos últimos dominios de región constante de cadena pesada en el extremo C-terminal (CH2 y CH3), y las regiones Fc de IgE e IgM comprenden los tres últimos dominios de región constante de cadena pesada en el extremo C-terminal (CH2, CH3 y CH4). Una región de bisagra, una cadena J y similares, si están presentes, también se incluyen en el término "región Fc". Por ejemplo, la región Fc de la IgG1 humana incluye un polipéptido compuesto por el dominio CH2 y el dominio CH3, y un polipéptido compuesto por una porción o la totalidad de la región bisagra, y el dominio CH2 y el dominio CH3. Las regiones Fc en anticuerpos de otras clases se pueden determinar mediante el alineamiento de secuencia con la cadena pesada de IgG1 humana o un fragmento de la misma.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "producto de fusión de la variante de IdeZ-región Fc (o variante de la región Fc)" (es decir, proteína de fusión) pretende incluir tanto una estructura en la que una variante de IdeZ está unida a cada uno de los extremos N de un complejo de dos regiones Fc, como una estructura de un solo brazo en la que la variante de IdeZ está unida a solo una de las regiones Fc.

Términos como "producto de fusión de una variante de IdeZ sialilada con una región Fc (o variante de la región Fc)" y "proteína de fusión sialilada" significan un producto de fusión o similar de una variante de IdeZ y una región Fc (o variante de la región Fc) a la que se añade intencionalmente ácido siálico mediante un paso de sialilación (por ejemplo, tratamiento con β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1) que se utiliza habitualmente en la técnica. Por otra parte, tal como se utiliza en el presente documento, términos como "producto de fusión de una variante de IdeZ no sialilada con una región Fc (o variante de la región Fc)" y "proteína de fusión no sialilada" significan un producto de fusión o similar de una variante de IdeZ y una región Fc (o variante de la región Fc) sin el paso de sialilación mencionado anteriormente, y no se impide que la proteína de fusión contenga ácido siálico.

Como se utiliza en este documento, el término "secuencia consenso de una cadena de azúcar ligada a N" en IdeZ significa una secuencia ubicada en un sitio de glicosilación, que se requiere para modificar una cadena de azúcar ligada a un residuo de asparagina de un polipéptido, y es, por ejemplo, una secuencia de asparagina (N)-X-serina (S)/treonina (T) (en donde X es un aminoácido distinto de prolina). La IdeZ de tipo silvestre representada por SEQ ID NO: 1 tiene la secuencia consenso en las posiciones 118 a 120, las posiciones 171 a 173, las posiciones 267 a 269 y las posiciones 298 a 300.

Los números de residuos de aminoácidos de una secuencia de anticuerpos, como una región Fc, utilizada en la presente especificación, se prescriben de acuerdo con el índice de la UE de Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed, 1991, Publicación de NIH núm. 91-3242).

Tal como se utiliza en este documento, el término "primera" o "segunda" se utiliza para una discriminación conveniente si están presentes dos o más tipos de porciones. El uso de tal término no pretende proporcionar un orden o significado específico, a menos que se especifique lo contrario.

En la presente especificación, un enlazador peptídico puede o no estar presente. El "enlazador peptídico" significa uno o más residuos de aminoácidos arbitrarios que pueden introducirse mediante ingeniería genética para unir dos o más porciones. La longitud del enlazador peptídico utilizado en la presente invención no está particularmente limitada y puede ser seleccionada apropiadamente por aquellos expertos en la materia dependiendo del propósito.

Tal como se utiliza en este documento, el término "identidad" significa un valor de identidad obtenido con parámetros proporcionados como predeterminados utilizando EMBOSS Needle (Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, pág. W580-W584). Los parámetros son los siguientes.

Penalización por apertura de hueco = 10

Penalización por ampliación de hueco = 0,5

Matriz = EBLOSUM62

Penalización por fin de hueco = falso

Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" significa un humano u otros animales que necesitan prevención o tratamiento. En cierto aspecto, el sujeto es un humano que necesita prevención o tratamiento.

2. Variante de IdeZ

(1) Variante de IdeZ

La variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad de la presente invención es una variante de IdeZ que tiene actividad de cisteína proteasa de IgG, la variante

(a) comprende una secuencia 90 % o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de las posiciones 35 a 349 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (IdeZ de tipo silvestre); y

(b) tiene aminoácidos no glicosilados en una posición correspondiente a la posición 118 y una posición correspondiente a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

Los presentes inventores han descubierto que la atenuación de la actividad de proteasa de IdeZ que tiene dichos aminoácidos no glicosilados en las posiciones 118 y 267 se suprime incluso cuando IdeZ se expresa en células de mamíferos. Al mismo tiempo, los presentes inventores también han descubierto que un problema en la producción de IdeZ de tipo silvestre utilizando células de mamíferos es una disminución en el nivel de expresión; y dicha disminución en el nivel de expresión se suprime cuando la variante de IdeZ mencionada anteriormente se produce utilizando células de mamíferos.

La glicosilación se evita en las posiciones mencionadas anteriormente, por ejemplo, variando los aminoácidos en la posición correspondiente a la posición 118 y la posición correspondiente a la posición 267 a aminoácidos distintos de la asparagina, o añadiendo una variación de aminoácidos a la secuencia consenso de una cadena de azúcar ligada a N que incluya estas posiciones. La glicosilación se evita añadiendo al menos una variación de aminoácido a la secuencia consenso antes mencionada de la cadena de azúcar ligada a N que contiene asparagina. Sin embargo, ninguna cadena de azúcar puede estar unida a una secuencia correspondiente a la secuencia consenso, dependiendo de su secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, para una secuencia consenso NXS/T, se ha reportado que NXT puede tener una mayor eficiencia de glicosilación que la de NXS (cuando X es el mismo aminoácido y ambas secuencias están ubicadas en la misma posición en las proteínas) (Biochem. J., 1981, Vol. 195, págs. 639-644; Biochemistry, 1999, Vol. 38, págs. 13584-13591; Biochem. J., 2001, Vol. 355, 245-248; y Biochem. J., 1997, Vol. 323, 415-419).

De acuerdo con una modalidad, la variante de IdeZ puede comprender las variaciones de aminoácidos (b') y (b'') que se indican a continuación. Estas variaciones de aminoácidos pueden producir una variante de IdeZ que tenga aminoácidos no glicosilados en una posición correspondiente a la posición 118 y una posición correspondiente a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1. Cada una de las variaciones de aminoácidos (b') y (b'') puede tener al menos una o más de las variaciones (i) a (iii):

(b')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 118 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

(ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 119 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 120 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano; y

(b'')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 267 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

(ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 268 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 269 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que

consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano.

Preferiblemente, en la variante de IdeZ, un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 120 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por ácido glutámico y un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 269 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por arginina.

La variante de IdeZ preferiblemente tiene además (c) un aminoácido no glicosilado en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, y/o (d) un aminoácido no glicosilado en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1. En otras palabras, se prefieren los aminoácidos no glicosilados en las posiciones 118 y 267 como se mencionó anteriormente, así como los aminoácidos no glicosilados en las posiciones 171 y/o 298. Esto se debe a que la actividad de la proteasa mejora aún más al disminuir la cantidad de cadena de azúcar añadida. La glicosilación se evita, por ejemplo, variando los aminoácidos en la posición correspondiente a la posición 171 y/o la posición correspondiente a la posición 298 por aminoácidos distintos de la asparagina, o añadiendo una variación de aminoácidos a la secuencia de consenso de una cadena de azúcar ligada a N que incluya estas posiciones. Los contenidos específicos de la variación de aminoácido que impide la unión de la cadena de azúcar son los mismos que los mencionados sobre la variación de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 118 y la posición correspondiente a la posición 267 descritas anteriormente.

Una variación de este tipo es, por ejemplo, la que se describe a continuación. De acuerdo con una modalidad, la variante de IdeZ comprende las siguientes variaciones de aminoácidos (c') y/o (d'):

(c')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

(ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 172 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 173 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano; y

(d')

(i) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glicina, alanina, serina, prolina, valina, treonina, cisteína, isoleucina, leucina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano;

(ii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 299 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por prolina; y/o

(iii) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 300 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que
 5 consiste en glicina, alanina, prolina, valina, cisteína, isoleucina, leucina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, lisina, ácido glutámico, metionina, histidina, fenilalanina, arginina, tirosina y triptófano.

Preferiblemente, en la variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad, un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por glicina y/o un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia
 10 de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 está sustituido por ácido aspártico.

Más preferiblemente, la variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad tiene de dos a cuatro variaciones de aminoácidos seleccionadas entre las siguientes variaciones de aminoácidos (a) a (d):

(a) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 120 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 está sustituido por ácido glutámico,

15 (b) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 171 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por glicina,

(c) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 269 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 se sustituye por arginina, y

(d) un aminoácido en la posición correspondiente a la posición 298 de la secuencia de aminoácidos
 20 representada por SEQ ID NO: 1 está sustituido por ácido aspártico.

La variante de IdeZ puede tener de dos a cuatro variaciones de aminoácidos, más preferiblemente tres o cuatro variaciones de aminoácidos, particularmente preferiblemente cuatro variaciones de aminoácidos, seleccionadas entre las variaciones de aminoácidos (a) a (d) en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1. En el caso de seleccionar dos o tres de las variaciones de aminoácidos
 25 (a) a (d), la combinación de las mismas es arbitraria y preferiblemente incluye las variaciones de aminoácidos (a) y (c), (a), (b) y (c), o (a), (c) y (d).

De manera particularmente preferible, la variante IdeZ de acuerdo con una modalidad comprende una secuencia de aminoácidos 90 % o más, 95 % o más, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 5, 9 o 13.

30 La variante IdeZ de acuerdo con una modalidad puede comprender una variación de aminoácido distinta a las mencionadas anteriormente.

La variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad, cuando se produce utilizando células de mamíferos, tiene preferiblemente de 10 a 100 veces, de 10 a 70 veces o de 10 a 40 veces la actividad de proteasa de IdeZ de tipo silvestre. Dado que una porción de IdeZ contribuye a la actividad de proteasa,
 35 una proteína de fusión de la región Fc con una variante de IdeZ mencionada más adelante también tiene actividad de proteasa.

(2) Polinucleótido y vector de expresión

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica la variante IdeZ mencionada anteriormente. Los expertos en la materia son capaces de preparar la variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad mediante el uso de un método conocido en la técnica sobre la base de su secuencia de nucleótidos. La variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad puede sintetizarse mediante el uso, por ejemplo, de un método de síntesis genética conocido en la técnica. Se pueden utilizar como métodos de síntesis genética diversos conocidos por los expertos en la materia, tales como un método de síntesis de genes de anticuerpos descrito en la Publicación Internacional núm. WO 90/07861.

De acuerdo con una modalidad adicional, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido mencionado anteriormente.

El vector de expresión de acuerdo con una modalidad no está particularmente limitado siempre que el polinucleótido pueda producirse en diversas células hospederas tales como células eucariotas (por ejemplo, células animales, células de insectos, células vegetales o levaduras) o células procariotas (por ejemplo, *E. coli*). Los ejemplos de dicho vector de expresión incluyen vectores plasmídicos y vectores de virus. Por ejemplo, se pueden utilizar como vector plasmídico la serie pcDNA (Thermo Fisher Scientific Inc.), pALTER(R)-MAX (Promega Corp.), pHEK293 Ultra Expression Vector (Takara Bio Inc.), o pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza Biologics plc). Por ejemplo, se pueden utilizar como vector viral lentivirus, adenovirus, retrovirus o virus adenoasociados. Por ejemplo, en el caso de utilizar lentivirus para introducir el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en células, se puede utilizar como lentivirus el vector pLV SIN-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.), el vector pLenti (Thermo Fisher Scientific Inc.) o similar. En una modalidad, el vector para usarse en el vector de expresión de acuerdo con una modalidad es pcDNA(TM)3.4-TOPO(R) (Thermo Fisher Scientific Inc.) y pcDNA(TM)3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

El vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un promotor unido operativamente al polinucleótido mencionado anteriormente. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido mencionado anteriormente en células animales incluyen promotores derivados de virus como CMV, RSV y SV40, promotor de actina, promotor de EF (factor de elongación) 1 α y promotor de choque térmico. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido mencionado anteriormente en una bacteria (por ejemplo, una bacteria del género *Escherichia*) incluyen el promotor trp, el promotor lac, el promotor λ PL y el promotor tac. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido mencionado anteriormente en una levadura incluyen el promotor GAL1, el promotor GAL10, el promotor PH05, el promotor PGK, el promotor GAP y el promotor ADH.

En el caso de utilizar células animales, células de insectos o una levadura como células hospederas, el vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un codón de inicio y un codón de paro. En este caso, el vector de expresión puede contener, por ejemplo, una secuencia potenciadora, regiones no traducidas 5' y 3' de un gen que codifica la variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad, una secuencia señal secretora, una unión de empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable. En el caso de utilizar *E. coli* como células hospederas, el vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un codón de inicio, un codón de paro, una región terminadora y una unidad replicable. El vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un gen marcador de

selección de fármacos (por ejemplo, gen de resistencia a la tetraciclina, gen de resistencia a la ampicilina, gen de resistencia a la kanamicina, gen de resistencia a la neomicina o gen de dihidrofolato reductasa) generalmente utilizado según un propósito.

(3) Célula hospedera

5 De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una célula hospedera transformada con el vector de expresión mencionado anteriormente. La célula hospedera de acuerdo con una modalidad puede contener uno o más polinucleótidos de acuerdo con una modalidad mediante transformación con el vector de expresión de acuerdo con una modalidad.

10 La célula hospedera a transformar no está particularmente limitada siempre que la célula hospedera sea compatible con el vector de expresión utilizado y pueda expresar el polipéptido de acuerdo con una modalidad mediante transformación con el vector de expresión. Como célula hospedera a transformar se pueden utilizar diversas células, como las células convencionales habitualmente utilizadas en la técnica o las células establecidas artificialmente. Entre los ejemplos se incluyen células animales (células CHO-K1, células ExpiCHO-S(TM), células CHOK1SV, células CHO-DG44, células HEK293, 15 células NS0, etc.), células de insectos (Sf9, etc.), bacterias (bacterias del género *Escherichia*, etc.) y levaduras (el género *Saccharomyces*, el género *Pichia*, etc.). En una modalidad, las células hospederas son células CHO-K1 o células ExpiCHO-S.

20 El método para transformar la célula hospedera no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede utilizar un método generalmente utilizado por los expertos en la materia, como el método de fosfato de calcio, la electroporación o la lipofección.

La célula hospedera transformada se puede seleccionar mediante un método generalmente utilizado por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar como método de selección un método de aislamiento de células, como un método de selección de fármacos que utiliza un gen marcador de selección de fármacos y un fármaco como tetraciclina, ampicilina, neomicina o higromicina, un método 25 de dilución limitante, un método de clasificación de células individuales o un método de recolección de colonias.

(4) Método para producir la variante de IdeZ

Los expertos en la materia son capaces de preparar la variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad mediante el uso de un método conocido en la técnica sobre la base de información de secuencia y similares divulgados en la presente especificación. La variante de IdeZ se puede obtener, por ejemplo, 30 añadiendo una variación de aminoácido a IdeZ de tipo silvestre mediante un método habitualmente utilizado en la técnica. Un método de este tipo puede comprender, por ejemplo, los pasos de: cultivar la célula hospedera transformada mencionada anteriormente de modo que la variante de IdeZ se exprese en la célula hospedera o en un sobrenadante de cultivo; y recuperar, aislar o purificar la variante de IdeZ, aunque 35 no se limita a estos métodos siempre que se produzca la variante de IdeZ de interés. Los métodos específicos para el cultivo, la purificación y similares se describen en un método para producir un polipéptido mencionado más adelante.

(5) Uso

La variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad se puede emplear en el uso conocido hasta ahora en la técnica sobre la cisteína proteasa de IgG. Dicho uso se describe, por ejemplo, en la sección “Antecedentes de la invención”. Entre sus ejemplos se incluyen el uso en sistemas de producción de proteínas recombinantes de alta calidad, la supresión del rechazo en trasplantes y el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Literatura de patente 1 y 2, WO2006/131347, WO2016/012285, etc.). Alternativamente, un posible uso es, por ejemplo, el pretratamiento de la terapia génica utilizando AAV (Literatura de patente 1).

3. *Polipéptido que comprende la variante de IdeZ, la variante de la región Fc y el polipéptido que comprende la variante de la región Fc*

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende la variante de IdeZ mencionada anteriormente. El tipo de polipéptido no está limitado siempre que el polipéptido comprenda la variante de IdeZ mencionada anteriormente. En una modalidad, el polipéptido que comprende la variante de IdeZ mencionada anteriormente es una proteína de fusión de la variante de IdeZ mencionada anteriormente y una región Fc.

El origen de la región Fc no está particularmente limitado. Por ejemplo, una región Fc de tipo IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM existe como una región Fc de anticuerpo. La región Fc utilizada puede derivarse de cualquiera de estos anticuerpos y preferiblemente se deriva de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), más preferiblemente de IgG humana, aún más preferiblemente de Ig γ 1 humana, Ig γ 2 humana, Ig γ 3 humana o Ig γ 4 humana, particularmente preferiblemente de Ig γ 1 humana.

Los presentes inventores han descubierto que el uso de una variante de la región Fc que tiene una variación de aminoácido predeterminada en la región Fc en forma de una proteína de fusión con la variante de IdeZ mencionada anteriormente puede suprimir la autodigestión de la proteína de fusión. Por consiguiente, de acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una proteína de fusión de la variante de IdeZ y una variante de la región Fc. Dado que IdeZ es una cisteína proteasa que actúa sobre una bisagra y escinde esta porción, un posible problema con una proteína de fusión de IdeZ unida a una región Fc es la autodigestión por la cual IdeZ actúa sobre la bisagra en su propia proteína de fusión y la escinde. En consecuencia, los presentes inventores se han centrado en las propiedades de IdeZ o similar que tiene la acción de escindir un sitio entre Fab y Fc de IgG humana, pero no actúa sobre IgG de ratón (IgG1 o IgG2b), y han construido una proteína de fusión combinando una región Fc estructuralmente similar a IgG de ratón con la variante de IdeZ. Como resultado, se ha descubierto que la autodigestión queda suprimida.

Específicamente, las variaciones como se describe a continuación se agregan preferiblemente a la región Fc para usarse en la proteína de fusión de la variante de IdeZ y la variante de la región Fc.

De acuerdo con una modalidad, en la variante de la región Fc para usarse en la proteína de fusión, el residuo de aminoácido 236 está sustituido por ácido glutámico y el residuo de aminoácido 237 está sustituido por valina.

Preferiblemente, en la variante de la región Fc, además, el residuo de aminoácido 234 está sustituido por alanina, y el residuo de aminoácido 235 está sustituido por ácido glutámico.

Más preferiblemente, la variante de la región Fc comprende una o más de las siguientes variaciones de aminoácidos: el residuo de aminoácido 227 está sustituido por histidina, el residuo de aminoácido 228 está sustituido por lisina, el residuo de aminoácido 233 está sustituido por asparagina y/o el residuo de aminoácido 238 está sustituido por serina, además de los descritos anteriormente.

Además, preferiblemente, la variante de la región Fc comprende una o más de las siguientes variaciones de aminoácidos: el residuo de aminoácido 253 está sustituido por alanina, el residuo de aminoácido 293 o 294 está eliminado, y/o el residuo de aminoácido 296 está sustituido por alanina, además de los descritos anteriormente.

De manera particularmente preferible, la variante de la región Fc se selecciona entre las siguientes regiones Fc (1) y (2):

(1)

una variante de la región Fc en la que
el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina,
el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico,
el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico,
el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,
el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina, y
el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina; y

(2)

una variante de la región Fc en la que
el residuo de aminoácido 227 se sustituye por histidina,
el residuo de aminoácido 228 se sustituye por lisina,
el residuo de aminoácido 233 se sustituye por asparagina,
el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina,
el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico,
el residuo de aminoácido 236 se sustituye por ácido glutámico,
el residuo de aminoácido 237 se sustituye por valina,
el residuo de aminoácido 238 se sustituye por serina,
el residuo de aminoácido 253 se sustituye por alanina, y
el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina.

Más específicamente, la variante de la región Fc comprende una secuencia 90 % o más, más preferiblemente 95 % o más, aún más preferiblemente 100 %, idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las porciones de la región Fc en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, 17, 21 y 22, es decir, una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16, una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada

por SEQ ID NO: 17, una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 21, y aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 22. La variante de la región Fc que tiene dicha secuencia se prefiere en términos de un efecto supresor de la autodigestión. En particular, la variante de la región Fc que tiene la secuencia de la porción de la región Fc en SEQ ID NO: 16 o 21 o una secuencia 90 % o más, más preferiblemente 95 % o más, idéntica a la misma es más preferida porque hay pocas sustancias extrañas involucradas en la producción. Además, la variante de la región Fc que tiene la secuencia de la porción de la región Fc en SEQ ID NO: 16 o una secuencia 90 % o más, más preferiblemente 95 % o más, idéntica a la misma se prefiere porque solo se introducen unas pocas variaciones de aminoácidos y se obtiene una alta tasa de sialilación.

En particular, las variaciones de los aminoácidos L234A y L235A en una región constante de Ig γ 1 humana se denominan "mutaciones LALA". En este contexto, L234A es la sustitución de leucina en la posición 234 de acuerdo con el índice de la UE en la región constante de Ig γ 1 humana por alanina. L235A es la sustitución de leucina en la posición 235 de acuerdo con el índice de la UE en la región constante de Ig γ 1 humana por alanina. Las variaciones de los aminoácidos L234A y L235E se denominan "mutaciones LALE". En este contexto, L235E es la sustitución de leucina en la posición 235 de acuerdo con el índice de la UE en la región constante de Ig γ 1 humana por ácido glutámico.

Como se menciona más adelante, para reducir la producción de ADA (anticuerpo antidrogas), se prefiere mejorar la tasa de sialilación de la región Fc. La delección de un aminoácido en la posición 293 o 294 contribuye a mejorar la tasa de sialilación. La variante de la región Fc comprende preferiblemente las mutaciones LALA y las mutaciones LALE, además de esas variaciones.

La variante de la región Fc puede comprender una variación distinta a las mencionadas anteriormente. Aunque dicha variación no está particularmente limitada siempre que se puedan lograr los efectos deseados, la variante de la región Fc puede comprender, por ejemplo, variaciones basadas en la tecnología de perillas en agujeros (en adelante, también denominadas "mutaciones de perillas en agujeros"). Las mutaciones del tipo "perillas en agujeros" son, por ejemplo, mutaciones que sustituyen un aminoácido en la posición 366 de una región Fc en un dímero de la región Fc por triptófano, y sustituyen, en la otra región Fc, un aminoácido en la posición 366 por serina, un aminoácido en la posición 368 por alanina, y un aminoácido en la posición 407 por valina (Publicación Internacional núm. WO 1998/050431).

El producto de fusión de la región Fc-variante IdeZ (o variante de la región Fc) (es decir, proteína de fusión) puede tener una estructura donde una variante de IdeZ está unida a cada uno de los extremos N de un complejo de dos regiones Fc, o una estructura de un solo brazo donde la variante de IdeZ está unida a una de las regiones Fc. En una modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión de la variante de IdeZ ligada al extremo N de la región Fc (o variante de la región Fc), y dos de estas proteínas de fusión forman un dímero. De acuerdo con otra modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión de un solo brazo que comprende una proteína de fusión de la variante de IdeZ unida al extremo N de una primera región Fc, y una segunda región Fc sin la variante de IdeZ unida a la misma. Como se menciona más adelante, la región Fc en la proteína de fusión está preferiblemente sialilada. La proteína

de fusión de un solo brazo que comprende la variante de la región Fc es capaz de lograr una tasa de sialilación relativamente alta sin el uso de glicosiltransferasa para la sialilación. Aunque un posible problema con la proteína de fusión de la región IdeZ-Fc es su fácil agregación, es poco probable que la proteína de fusión de un solo brazo cause tal problema de agregación.

5 En el caso de la proteína de fusión de un solo brazo, la primera región Fc y la segunda región Fc pueden comprender las mutaciones de perillas en agujeros mencionadas anteriormente, CRIB o BEAT (Vaccines 2021, 9 (7), 724). De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden preferiblemente las mutaciones de perillas en agujeros mencionadas anteriormente.

10 De acuerdo con una modalidad, la región Fc de la proteína de fusión de un brazo comprende, además de las variaciones de aminoácidos mencionadas anteriormente, las siguientes mutaciones de perillas en agujeros (1) o (2):

(1)

en la primera región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por triptófano, y

15 en la segunda región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por serina, el residuo de aminoácido 368 está sustituido por alanina y el residuo de aminoácido 407 está sustituido por valina; y

(2)

en la primera región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por serina, el residuo de aminoácido 368 está sustituido por alanina y el residuo de aminoácido 407 está sustituido por valina; y

20 en la segunda región Fc, el residuo de aminoácido 366 está sustituido por triptófano.

La proteína de fusión que comprende la variante de IdeZ mencionada anteriormente se puede emplear en el uso conocido hasta ahora en la técnica sobre la cisteína proteasa IgG, como se describe en la sección anterior "2. Variante de IdeZ (5) Uso".

25 De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una variante de la región Fc en sí misma adecuada para el uso mencionado anteriormente. Las variaciones de aminoácidos específicos y similares son como se mencionó anteriormente sobre la variante de la región Fc que actúa como componente de la proteína de fusión con la variante de IdeZ.

De acuerdo con una modalidad, la presente invención también proporciona un polipéptido (proteína de fusión) que comprende una proteína adicional y la variante de la región Fc mencionada anteriormente.

30 Los ejemplos de la proteína adicional que se puede utilizar incluyen, entre otros, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno (fragmento variable de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, etc.) de anticuerpos y péptidos bioactivos (por ejemplo, receptores, moléculas de adhesión, ligandos y enzimas). El polipéptido que comprende la variante de la región Fc es insusceptible a la escisión por la cisteína proteasa de IgG.

35 En una modalidad, la presente invención también proporciona una proteína de fusión de la cisteína proteasa de IgG y la variante de la región Fc mencionada anteriormente. Como se describió anteriormente, el uso de la variante de la región Fc puede suprimir la autodigestión de la proteína de fusión de la variante de IdeZ y la variante de la región Fc. Estos efectos también se pueden obtener en un producto de fusión

de la cisteína proteasa de IgG distinta de la variante de IdeZ. Dicha cisteína proteasa de IgG no está limitada siempre que tenga la actividad de escindir IgG. Entre los ejemplos se incluyen IdeS, IdeZ, IdeZ2, IdeE, IdeE2, IdeP, IdeSORK e Igde y sus variantes. Entre ellos, se prefiere IdeZ o la variante de IdeZ antes mencionada de acuerdo con una modalidad. En una determinada modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión de la cisteína proteasa de IgG unida al extremo N de la variante de la región Fc, y dos de estas proteínas de fusión forman un dímero. En una determinada modalidad, la variante de la región Fc utilizada comprende una secuencia 90 % o más, más preferiblemente 95 % o más, aún más preferiblemente 100 %, idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 16, una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 17, una secuencia que consiste en aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 21, y aminoácidos en las posiciones 316 a 541 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 22. De acuerdo con otra modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión de un solo brazo que comprende una proteína de fusión de la cisteína proteasa de IgG unida al extremo N de una primera región Fc, y una segunda región Fc sin la cisteína proteasa de IgG unida a la misma. En una determinada modalidad, en el caso de una proteína de fusión de un solo brazo, la primera región Fc y la segunda región Fc comprenden las mutaciones de perillas en agujeros mencionadas anteriormente.

4. *Polinucleótido y vector de expresión*

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido mencionado anteriormente. Los expertos en la materia son capaces de preparar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad mediante el uso de un método conocido en la técnica sobre la base de su secuencia de nucleótidos. El polinucleótido de acuerdo con una modalidad puede sintetizarse mediante el uso, por ejemplo, de un método de síntesis genética conocido en la técnica. Se pueden utilizar como métodos de síntesis genética diversos conocidos por los expertos en la materia, tales como un método de síntesis de genes de anticuerpos descrito en la Publicación Internacional núm. WO 90/07861.

De acuerdo con una modalidad adicional, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido mencionado anteriormente. En el caso de la proteína de fusión de un solo brazo, un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la variante de IdeZ ligada al extremo N de la primera región Fc, y un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de un solo brazo que comprende la segunda región Fc sin la variante de IdeZ ligada a la misma pueden estar contenidos por separado en diferentes vectores, o una pluralidad de polinucleótidos puede estar contenida en un vector.

El vector de expresión de acuerdo con una modalidad no está particularmente limitado siempre que el polinucleótido de acuerdo con una modalidad pueda producirse en varias células hospederas tales como células eucariotas (por ejemplo, células animales, células de insectos, células vegetales o levaduras) o células procariotas (por ejemplo, *E. coli*). Los ejemplos de dicho vector de expresión incluyen vectores plasmídicos y vectores de virus. Por ejemplo, se pueden utilizar como vector plasmídico la serie pcDNA (Thermo Fisher Scientific Inc.), pALTER(R)-MAX (Promega Corp.), pHEK293 Ultra Expression Vector

(Takara Bio Inc.), o pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza Biologics plc). Por ejemplo, se pueden utilizar como vector viral lentivirus, adenovirus, retrovirus o virus adenoasociados. Por ejemplo, en el caso de utilizar lentivirus para introducir el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en células, se puede utilizar como lentivirus el vector pLV5IN-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.), el vector pLenti (Thermo Fisher Scientific Inc.) o similar. En una modalidad, el vector para usarse en el vector de expresión de acuerdo con una modalidad es pcDNA(TM)3.4-TOPO(R) (Thermo Fisher Scientific Inc.) y pcDNA(TM)3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

El vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un promotor unido operativamente al polinucleótido de la presente invención. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en células animales incluyen promotores derivados de virus tales como CMV, RSV y SV40, promotor de actina, promotor de EF (factor de elongación) 1 α y promotor de choque térmico. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en una bacteria (por ejemplo, una bacteria del género *Escherichia*) incluyen el promotor trp, el promotor lac, el promotor λ PL y el promotor tac. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en una levadura incluyen el promotor GAL1, el promotor GAL10, el promotor PH05, el promotor PGK, el promotor GAP y el promotor ADH.

En el caso de utilizar células animales, células de insectos o una levadura como células hospederas, el vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un codón de inicio y un codón de paro. En este caso, el vector de expresión puede contener, por ejemplo, una secuencia potenciadora, regiones no traducidas 5' y 3' de un gen que codifica la variante de la región Fc de acuerdo con una modalidad, una secuencia señal secretora, una unión de empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable. En el caso de utilizar *E. coli* como células hospederas, el vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un codón de inicio, un codón de paro, una región terminadora y una unidad replicable. El vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un gen marcador de selección de fármacos (por ejemplo, gen de resistencia a la tetraciclina, gen de resistencia a la ampicilina, gen de resistencia a la kanamicina, gen de resistencia a la neomicina o gen de dihidrofolato reductasa) generalmente utilizado según un propósito.

5. Célula hospedera

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una célula hospedera transformada con el vector de expresión mencionado anteriormente. La célula hospedera de acuerdo con una modalidad puede contener uno o más polinucleótidos de acuerdo con una modalidad mediante transformación con el vector de expresión de acuerdo con una modalidad.

La célula hospedera a transformar no está particularmente limitada siempre que la célula hospedera sea compatible con el vector de expresión utilizado y pueda expresar el polipéptido de acuerdo con una modalidad mediante transformación con el vector de expresión. Como célula hospedera a transformar se pueden utilizar diversas células, como las células convencionales habitualmente utilizadas en la técnica o las células establecidas artificialmente. Entre los ejemplos se incluyen células animales (células CHO-K1, células ExpCHO-S(TM), células CHOK1SV, células CHO-DG44, células HEK293, células NS0, etc.), células de insectos (Sf9, etc.), bacterias (bacterias del género *Escherichia*, etc.) y

levaduras (el género *Saccharomyces*, el género *Pichia*, etc.). En una modalidad, las células hospederas son células CHO-K1 o células ExpiCHO-S.

El método para transformar la célula hospedera no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede utilizar un método generalmente utilizado por los expertos en la materia, como el método de fosfato de calcio, la electroporación o la lipofección.

La célula hospedera transformada se puede seleccionar mediante un método generalmente utilizado por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar como método de selección un método de aislamiento de células, como un método de selección de fármacos que utiliza un gen marcador de selección de fármacos y un fármaco como tetraciclina, ampicilina, neomicina o higromicina, un método de dilución limitante, un método de clasificación de células individuales o un método de recolección de colonias.

6. Método para producir polipéptidos

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir el polipéptido que comprende la variante de IdeZ de acuerdo con una modalidad. El método de acuerdo con una modalidad puede comprender, por ejemplo, los pasos de: cultivar la célula hospedera transformada mencionada anteriormente de modo que el polipéptido se exprese en la célula hospedera o en un sobrenadante de cultivo; y recuperar, aislar o purificar el polipéptido, aunque no se limita a estos métodos siempre que se produzca el polipéptido de interés.

La célula hospedera transformada puede cultivarse mediante un método conocido en la técnica. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH de un medio y el tiempo de cultivo, son seleccionadas apropiadamente por aquellos expertos en la materia. Cuando la célula hospedera es una célula animal, por ejemplo, medio MEM (Science, 1959, Vol. 130, p. 432-437), medio DMEM (Virology, 1959, Vol. 8, p. 396), medio RPMI-1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, p. 519), o medio 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, p. 1-8) que contienen aproximadamente 5 a 20 % de suero bovino fetal pueden utilizarse como medio. El pH del medio es, por ejemplo, aproximadamente de 6 a 8. El cultivo se realiza habitualmente a una temperatura de 30 a 40 °C aproximadamente durante 15 a 336 horas, si es necesario, con aireación o agitación. Cuando las células hospederas son células de insecto, por ejemplo, el medio de Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985, Vol. 82, p. 8404) que contiene suero bovino fetal se puede utilizar como medio. El pH del medio es, por ejemplo, aproximadamente de 5 a 8. El cultivo se realiza habitualmente a una temperatura de 20 a 40 °C aproximadamente durante 15 a 100 horas, si es necesario, con aireación o agitación.

Cuando la célula hospedera es *E. coli* o una levadura, por ejemplo, un medio líquido que contenga un nutriente es apropiado como medio. El medio nutritivo contiene, por ejemplo, una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico necesaria para el crecimiento de la célula hospedera transformada. Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen glucosa, dextrano, almidón soluble y sacarosa. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno inorgánico o de nitrógeno orgánico incluyen sales de amonio, nitratos, aminoácidos, licor de maíz fermentado, peptona, caseína, extractos de carne, torta de soya y extractos de papa. Se pueden incluir otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por

ejemplo, cloruro de calcio, fosfato disódico y cloruro de magnesio) y vitaminas) y antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina y kanamicina), si se desea. El pH del medio es, por ejemplo, aproximadamente de 5 a 8. Cuando la célula hospedera es *E. coli*, por ejemplo, se puede utilizar como medio el medio LB o el medio M9 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 3, A2.2). El cultivo se realiza habitualmente a una temperatura de 14 a 43 °C aproximadamente durante 3 a 24 horas, si es necesario, con aireación o agitación. Cuando la célula hospedera es una levadura, por ejemplo, medio mínimo de Burkholder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1980, Vol. 77, p. 4505) puede utilizarse como medio. El cultivo se realiza habitualmente a una temperatura de 20 a 35 °C aproximadamente durante 14 a 144 horas, si es necesario, con aireación o agitación. El polipéptido de interés puede ser expresado por el cultivo como se mencionó anteriormente.

El método de acuerdo con una modalidad puede comprender además el paso de recuperar, aislar o purificar el polipéptido de la célula hospedera, además del paso de cultivar la célula hospedera transformada de modo que se exprese el polipéptido que comprende la variante de IdeZ. Los ejemplos del método de aislamiento o purificación incluyen métodos que explotan la solubilidad, como la precipitación con solventes y la salinización, métodos que explotan la diferencia en el peso molecular, como la diálisis, la ultrafiltración y la filtración en gel, métodos que explotan la carga, como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de hidroxapatita, métodos que explotan la afinidad específica, como la cromatografía de afinidad, métodos que explotan la diferencia en la hidrofobicidad, como la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, y métodos que explotan la diferencia en el punto isoeléctrico, como la electroforesis de enfoque isoeléctrico. En una modalidad, el polipéptido secretado en el sobrenadante de cultivo se puede purificar mediante cada cromatografía, por ejemplo, cromatografía en columna utilizando una columna de proteína A o una columna de proteína G.

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende la variante de IdeZ, produciéndose el polipéptido mediante el método de producción mencionado anteriormente.

7. Proteína de fusión sialilada

La región Fc en la proteína de fusión variante de IdeZ-región Fc (o variante de la región Fc) mencionada anteriormente puede estar sialilada (es decir, se le puede agregar ácido siálico). La sialilación de la región Fc puede inhibir la producción de ADA contra la proteína de fusión cuando esta se administra al cuerpo vivo. La región Fc preferiblemente tiene una variación para aumentar la tasa de sialilación. Los ejemplos de la región Fc que comprende dicha variación incluyen variantes de la región Fc que comprenden mutaciones LALA o mutaciones LALE y delección de un aminoácido en la posición 293 o 294. Cuando se elimina el residuo de aminoácido 294 y la interacción entre las posiciones 234 y 235 disminuye por las mutaciones LALA o las mutaciones LALE, se produce un espacio tridimensional en estos sitios. De este modo se acepta una distorsión adicional en la cadena de azúcar vinculada a la asparagina en la posición 297, lo que presumiblemente da como resultado un estado en el que el ácido siálico se agrega fácilmente. Ambos aminoácidos en las posiciones 293 y 294 suelen ser ácido glutámico en la IgG de tipo silvestre. Por lo tanto, se puede obtener la misma variación eliminando cualquiera de estos aminoácidos. En una

modalidad, en la variante de la región Fc, se elimina el ácido glutámico en la posición 293 o 294. De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una proteína de fusión variante de IdeZ-región Fc (o variante de región Fc) sialilada.

El método de sialilación no está particularmente limitado y la proteína de fusión sialilada se puede obtener agregando o expresando sialiltransferasa en el paso de cultivo de la célula hospedera mencionado anteriormente. Los ejemplos de dicha enzima incluyen β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1), sialiltransferasa y β -galactósido α -2,3-sialiltransferasa. Esto aumenta aún más la cantidad de ácido siálico añadido a la región Fc. La sialiltransferasa se puede agregar simplemente o se puede preparar un vector de expresión que tenga un inserto de ADN que codifique esta enzima, de modo que la enzima se coexpresen con un polipéptido tal como un anticuerpo. En el caso de añadir la sialiltransferasa, el momento o el método de adición no están particularmente limitados. La sialiltransferasa se puede añadir, por ejemplo, en el curso de la producción de polipéptidos mediante cultivo celular o se puede añadir y hacer reaccionar después de la purificación del polipéptido. En el caso de expresar la sialiltransferasa, los ejemplos de la misma incluyen, pero no se limitan a, un método para permitir que las células coexpresen un plásmido que codifica la sialiltransferasa y un plásmido que codifica el polipéptido para producir un polipéptido sialilado. En el caso de producir el polipéptido utilizando células que contienen glicosiltransferasa endógena, como las células CHO, se puede agregar ácido siálico en el curso de la producción del polipéptido sin la adición de la sialiltransferasa como se mencionó anteriormente.

La proteína de fusión que comprende la variante de la región Fc que comprende las variaciones para aumentar una tasa de sialilación como se mencionó anteriormente tiene una mayor cantidad de ácido siálico agregado (es decir, grado de sialilación) en comparación con la región Fc de tipo silvestre sialilada o una variante de la región Fc sialilada que tiene solo la delección de un aminoácido en la posición 294. Por ejemplo, aumenta la cantidad de ácido siálico añadido a la cadena de azúcar unida a la asparagina en la posición 297. La cantidad de ácido siálico agregada se puede medir como se describe en los ejemplos mencionados más adelante e indicar como "tasa de sialilación (%)". Como se utiliza en este documento, la "tasa de sialilación (%)" significa la relación de una cadena de azúcar que tiene un ácido siálico añadido a la misma con todas las cadenas de azúcar presentes en la región Fc, y un método de medición específico y un método de cálculo son como se describe en los ejemplos mencionados más adelante.

La proteína de fusión sialilada de acuerdo con una modalidad tiene una tasa de sialilación de, por ejemplo, 20 a 100 %, 40 a 100 %, 60 a 100 %, 80 a 100 % o 90 a 100 %.

La proteína de fusión y la proteína de fusión sialilada mencionadas anteriormente se pueden emplear en el uso conocido hasta ahora en la técnica de la cisteína proteasa de IgG. Dicho uso se describe, por ejemplo, en la sección "Antecedentes de la invención". Entre sus ejemplos se incluyen el uso en sistemas de producción de proteínas recombinantes de alta calidad, la supresión del rechazo en trasplantes y el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Literatura de patente 1 y 2, WO2006/131347, WO2016/012285, etc.). Alternativamente, la proteína de fusión así preparada es ventajosa por su fácil purificación o modificación y su vida media ajustable.

7. Composición farmacéutica

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la variante de IdeZ o el polipéptido mencionado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede preparar mediante un método habitualmente utilizado utilizando un excipiente habitualmente utilizado en la técnica, es decir, un excipiente farmacéutico, un vehículo farmacéutico o similar. Los ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica incluyen formulaciones parenterales tales como inyecciones y formulaciones para goteo intravenoso. Se pueden realizar administraciones como intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Para la producción de preparaciones, se pueden utilizar excipientes, vehículos, aditivos y similares apropiados para estas formas de dosificación en un rango farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de acuerdo con una modalidad puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales. La composición farmacéutica de acuerdo con una modalidad se puede utilizar en combinación (simultánea o secuencialmente) con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La cantidad de la variante de IdeZ o del polipéptido de acuerdo con una modalidad en la composición farmacéutica se puede establecer de manera apropiada dependiendo de la gravedad de los síntomas o la edad de un paciente, la forma de dosificación de la preparación utilizada, etc.

La variante de IdeZ o el polipéptido de acuerdo con una modalidad y la composición farmacéutica que lo contiene se pueden usar en la supresión del rechazo en el trasplante de órganos, el tratamiento de enfermedades autoinmunes, el pretratamiento de la terapia génica utilizando AAV y similares. De acuerdo con otra modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la variante de IdeZ o del polipéptido de acuerdo con una modalidad a un sujeto. De acuerdo con una modalidad adicional, la presente invención incluye la variante de IdeZ o el polipéptido de la presente invención para usarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmune. La presente invención también proporciona el uso de la variante de IdeZ o del polipéptido de acuerdo con una modalidad en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. La enfermedad autoinmune a tratar no está particularmente limitada.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la proteína de fusión IdeZ-Fc en células de mamíferos y evaluación de su actividad

Un gen que codifica una secuencia de aminoácidos de las posiciones 35 a 349 de la proteína IdeZ derivada de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (número de acceso UniProt: Q0PIW1, SEQ ID NO: 1) estaba unido en su lado 5' a una secuencia de ácido nucleico que codifica una señal de cadena pesada de anticuerpo (Protein Eng., 1987, Vol. 1, p. 499-505) y en su lado 3' a una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de Igγ1 de ratón (desde un aminoácido glicina en la posición 223 hasta lisina en la posición 447 de acuerdo con el índice de la UE) que alberga una mutación de aminoácido

D265A y una mutación de aminoácido F328C. La secuencia de ácido nucleico obtenida se insertó en el vector pcDNA3.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) para preparar un vector de expresión.

Las células ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific Inc.) se transfectaron con el vector de expresión obtenido que contenía una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión IdeZ-Fc y se cultivaron rotacionalmente durante 4 días en condiciones de 37 °C y 8 % de CO₂. Luego, se obtuvo una proteína de fusión IdeZ-Fc purificada de acuerdo con un método estándar. La proteína de fusión IdeZ-Fc obtenida se designó como proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón.

Se obtuvo una proteína de fusión variante de IdeZ-Fc mediante el uso del mismo enfoque que el anterior, preparando un vector de expresión que contenía una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante que alberga cuatro variaciones de aminoácidos (T120E/N171G/S269R/N298D de acuerdo con la numeración para SEQ ID NO: 1) en la proteína IdeZ como una variante de la secuencia consenso de una cadena de azúcar ligada a N. La proteína de fusión variante de IdeZ-Fc obtenida se designó como proteína de fusión variante de IdeZ A-Fc de ratón.

La secuencia de nucleótidos de IdeZ en la proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón se muestra en SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se muestra en SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos de la variante de IdeZ en la proteína de fusión variante de IdeZ A-Fc de ratón se muestra en SEQ ID NO: 4, y la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se muestra en SEQ ID NO: 5.

Cada proteína de fusión se trató térmicamente a 70 °C durante 10 minutos con la solución amortiguadora de muestra NuPAGE LDS (Life Technologies Corp., NP0008) y se evaluó su pureza mediante SDS-PAGE utilizando un gel NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Life Technologies Corp., NP0322BOX). El tratamiento de reducción se realizó mediante la adición del agente reductor de muestras NuPAGE (Life Technologies Corp., NP0009) durante el tratamiento térmico. El marcador de peso molecular utilizado fue Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc., 161-0363). El perfil electroforético de cada proteína de fusión se muestra en la Figura 1. Los resultados obtenidos en condiciones no reductoras indican el peso molecular de un homodímero y la presencia de un agregado, y los resultados obtenidos en condiciones reductoras indican el peso molecular de un monómero.

En la Figura 1, el carril 5 representa el marcador de peso molecular, el carril 7 representa la proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón y el carril 9 representa la proteína de fusión variante de IdeZ A-Fc de ratón. Se detectó una banda más fuerte y clara en una posición de pequeño peso molecular en la proteína de fusión variante de IdeZ A-Fc de ratón que tiene la secuencia consenso mutada de la cadena de azúcar ligada a N, en comparación con la proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón. Esto sugiere que la proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón tenía glicosilación ligada a N. Se confirmó que la proteína de fusión variante de IdeZ A-Fc de ratón estaba desglucosilada por la mutación en la secuencia de consenso de la cadena de azúcar ligada a N.

A continuación, se evaluó la actividad de proteasa de IgG de cada proteína de fusión mediante la evaluación de la escisión de un anticuerpo IgG1 humano. El anticuerpo que se iba a escindir era un anticuerpo IgG1 humano contra KLH (hemocianina de lapa) que está ausente in vivo (Publicación

Internacional núm. WO 2013/094723) (anti-KLH_hIgG1). A 10 µg del anticuerpo, se añadió cada proteína de fusión en cantidades de 1.0, 0.3, 0.1, 0.03 y 0.01 µg (proporciones de concentración final del anticuerpo con la proteína de fusión: 10, 33, 100, 333 y 1000 veces, respectivamente). El volumen final se fijó en 20 µL y el anticuerpo se trató a 37 °C durante 2 horas. La SDS-PAGE descrita anteriormente se llevó a cabo en condiciones reductoras. El perfil electroforético se muestra en la Figura 2.

En la Figura 2, la flecha 1 representa una cadena H. La flecha 2 representa un fragmento Fab'. Los carriles 3 a 7 representan los perfiles electroforéticos del anticuerpo escindido con la proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón en proporciones de concentración de anticuerpos de 10, 33, 100, 333 y 1000 veces, respectivamente. Los carriles 8 a 12 representan los perfiles electroforéticos del anticuerpo probado de la misma manera que el anterior utilizando la proteína de fusión variante A de IdeZ-Fc de ratón. El carril 13 representa el perfil electroforético únicamente de anti-KLH_hIgG1.

Sorprendentemente, se confirmó que la proteína de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón simplemente escindía el anticuerpo hasta una proporción de concentración del anticuerpo IgG1 humano con la proteína de fusión del orden de 33 veces, mientras que la proteína de fusión variante de IdeZ A-Fc de ratón fue capaz de escindir el anticuerpo hasta una proporción de concentración del orden de 1000 veces. Se confirmó que la N-glicosilación de IdeZ para expresarse en células de mamíferos produce la atenuación de la actividad de la proteasa; y la mutación en la secuencia consenso de la cadena de azúcar ligada a N mejora la actividad de la proteasa.

Ejemplo 2: Preparación de la forma de sustitución de 3 aminoácidos de la proteína de fusión IdeZ-Fc y evaluación de la actividad

A continuación, para confirmar la influencia de la secuencia consenso de cada cadena de azúcar ligada a N en la expresión y actividad de una proteína de fusión IdeZ-Fc en células de mamíferos, las proteínas de fusión IdeZ-Fc que tienen cada una tres variaciones de aminoácidos: variante 1 (N171G/S269R/N298D) (en adelante, denominada "proteína de fusión variante de IdeZ 1-Fc de ratón"), variante 2 (T120E/S269R/N298D) (en adelante, denominada "proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón"), variante 3 (T120E/N171G/N298D) (en adelante, denominada "proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón") y variante 4 (T120E/N171G/S269R) (en adelante, denominada "proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón") se prepararon mediante el mismo método que en el Ejemplo 1.

La secuencia de nucleótidos de la variante de IdeZ en la proteína de fusión variante de IdeZ 1-Fc de ratón se muestra en SEQ ID NO: 6, y la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se muestra en SEQ ID NO: 7. La secuencia de nucleótidos de la variante de IdeZ en la proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón se muestra en SEQ ID NO: 8, y la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se muestra en SEQ ID NO: 9. La secuencia de nucleótidos de la variante de IdeZ en la proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón se muestra en SEQ ID NO: 10, y la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se muestra en SEQ ID NO: 11. La secuencia de nucleótidos de la variante de IdeZ en la proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón se muestra en SEQ ID NO: 12, y la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se muestra en SEQ ID NO: 13.

La proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón, la proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón y la proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón pudieron producir proteínas purificadas, mientras que no se obtuvo ninguna proteína purificada de la proteína de fusión variante de IdeZ 1-Fc de ratón.

Posteriormente, estas proteínas fueron evaluadas en cuanto a su pureza mediante SDS-PAGE mediante el mismo método que en el Ejemplo 1. El perfil electroforético de cada proteína de la proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón, la proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón y la proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón se muestra en la Figura 3. En la Figura 3, el carril 5 representa la proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón, el carril 7 representa la proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón y el carril 9 representa la proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón.

La proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón tenía un peso molecular relativamente grande, lo que sugiere la glicosilación de asparagina en la posición 267.

A continuación, se evaluó la actividad de proteasa de cada proteína mediante la evaluación de la escisión de un anticuerpo IgG1 humano mediante el mismo método que en el Ejemplo 1. El perfil electroforético se muestra en la Figura 4.

En la Figura 4, la flecha 1 representa una cadena H. La flecha 2 representa un fragmento Fab'. Los carriles 3 a 7 del diagrama de la izquierda representan los perfiles electroforéticos del anticuerpo escindido con la proteína de fusión variante de IdeZ 2-Fc de ratón en proporciones de concentración de anticuerpos de 10, 33, 100, 333 y 1000 veces, respectivamente. Los carriles 8 a 12 representan los perfiles electroforéticos del anticuerpo probado de la misma manera que el anterior utilizando la proteína de fusión variante de IdeZ 3-Fc de ratón. Los carriles 3 a 7 del diagrama derecho representan los perfiles electroforéticos del anticuerpo probado de la misma manera que la anterior utilizando la proteína de fusión variante de IdeZ 4-Fc de ratón.

De manera interesante, se pudo confirmar que la proteína de fusión variante IdeZ 2-Fc de ratón y la proteína de fusión variante IdeZ 4-Fc de ratón escindían el anticuerpo en una proporción de concentración del anticuerpo IgG1 humano con respecto a la proteína de fusión del orden de 333 veces a 1000 veces, mientras que se pudo confirmar que la proteína de fusión variante IdeZ 3-Fc de ratón simplemente escindía el anticuerpo hasta la proporción de concentración del anticuerpo IgG1 humano con respecto a la proteína de fusión del orden de 33 veces. A partir de este resultado, las mutaciones en los motivos consenso de glicosilación ligados a N en Asn118 y Asn267 de SEQ ID NO: 1 son efectivas para la expresión de IdeZ en células de mamíferos y el mantenimiento de la actividad de proteasa.

Ejemplo 3-1: Preparación de la variante bivalente IdeZ A-variante 1 de Fc humana

Para obtener un producto de fusión de la variante A de IdeZ y una región Fc de IgG1 humana, cuya autodigestión fue suprimida, se diseñaron secuencias variantes de Fc humana. Para el diseño se tomaron como referencia las secuencias de IgG1 e IgG2b de ratón porque estos anticuerpos no son escindidos por IdeZ. Además, también se hizo referencia a una mutación Y296N o una mutación Y296R reportada como una mutación que dificulta la unión a IdeS. Además, se introdujeron una mutación E294del (J. Immunol. 2019, Vol. 202, p. 1582-1594, y WO2016/016586) y una mutación I253A (Intl. Immunol., 2006, Vol. 18, p.

1759-1769) en cada variante. En la Tabla 1 se muestra el nombre de cada variante y su secuencia diseñada.

Tabla 1

Nombre de la variante	Variación introducida en Fc humana	Aminoácido	ADN
Variante A de IdeZ- variante 5 de Fc humana	E233N/L234A/L235E/I253A/E294del	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25
Variante A de IdeZ- variante 6 de Fc humana	P227H/P228K/E233N/L234A/L235E/I253A/E294del	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 26
Variante A de IdeZ- variante 9 de Fc humana	L234A/L235E/I253A/E294del/Y296A	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 29
Variante A de IdeZ- variante 10 de Fc humana	L234A/L235E/I253A/E294del	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 30
Variante A de IdeZ- variante 11 de Fc humana	E233N/L234A/L235A/I253A/E294del/Y296A	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 31

El ADN que codifica cada variante A de IdeZ-variante de Fc humana se sintetizó de acuerdo con un método de rutina, se unió en su lado 5' a una secuencia de ácido nucleico que codifica una señal de cadena pesada de anticuerpo (Protein Eng., 1987, Vol. 1, p. 499-505), y se insertó en el vector pcDNA3.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) para preparar cada vector de expresión de variante A de IdeZ-variante de Fc humana.

Con el fin de conferir ácido siálico α 2,6-enlazado, las células ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific Inc.) se transfectaron con un vector de expresión que codifica la β -1,4-galactosiltransferasa 1 (B4GALT1) (número de acceso UniProt: P15291-1) y un vector de expresión que codifica la β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1 humana (ST6GAL1) (número de acceso UniProt: P15907-1), junto con el vector de expresión que codifica cada variante A de IdeZ-variante de Fc humana, y cultivadas rotacionalmente durante 4 días en condiciones de 37 °C y 8 % de CO₂. Se purificó un sobrenadante de cultivo utilizando MabSelect SuRe (Cytiva, 17-5438-02) de acuerdo con un método de rutina para obtener cada variante A de IdeZ-variante de Fc humana. La variante A de IdeZ-variante de Fc humana obtenida se denominó variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana. Cada variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana obtenida se analizó mediante SDS-PAGE mediante el método descrito en el Ejemplo 1. El perfil electroforético de cada variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana se muestra en la Figura 5.

En la Figura 5, el carril 1 representa el marcador de peso molecular, los carriles 2 a 6 representan la variante A de IdeZ sialilada-variante 5 de Fc humana, la variante A de IdeZ sialilada-variante 6 de Fc humana, la variante A de IdeZ sialilada-variante 9 de Fc humana, la variante A de IdeZ sialilada-variante 10 de Fc humana y la variante A de IdeZ sialilada-variante 11 de Fc humana, respectivamente.

En la variante A de IdeZ sialilada-Fc humana variantes 5, 6, 9, 10 y 11, se detectó una banda presumiblemente derivada de la región Fc humana en una posición entre 25 kDa y 37 kDa del marcador

de peso molecular en una condición reductora, lo que indica que la variante A de IdeZ sialilada-Fc humana variantes 5, 6, 9, 10 y 11 fueron autodigeridas.

Ejemplo 3-2: Preparación de la variante bivalente IdeZ A-variante 2 de Fc humana

Todas las variante A de IdeZ-variantes de Fc humana diseñadas en el Ejemplo 3-1 fueron autodigeridas. Por lo tanto, se diseñaron secuencias variantes de Fc humana que albergan otras mutaciones, con referencia a las secuencias de IgG1 e IgG2b de ratón. En la Tabla 2 se muestra el nombre de cada variante y su secuencia diseñada.

Tabla 2

Nombre de la variante	Variación introducida en Fc humana	Aminoácido	ADN
Variante A de IdeZ- variante 7 de Fc humana	L234A/L235E/G236E/G237V/I253A/E294 del	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 27
Variante A de IdeZ- variante 8 de Fc humana	P227H/P228K/E233N/L234A/L235E/G23 6E/G237V/P238S/I253A/E294del	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 28
Variante A de IdeZ- variante 17 de Fc humana	L234A/L235E/G236E/G237V/I253A/E294 del/Y296A	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 32
Variante A de IdeZ- variante 18 de Fc humana	P227H/P228K/E233N/L234A/L235E/G23 6E/G237V/P238S/I253A/E294del/Y296A	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 33

Cada variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana descrita en la Tabla 2 se obtuvo mediante el método descrito en el Ejemplo 3-1.

Para obtener cada variante A de IdeZ-variante de Fc humana preparada sin coexpresión con B4GALT1 y ST6GAL1, se transfectaron células ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific Inc.) con un vector de expresión que codifica cada variante A de IdeZ-variante de Fc humana y se cultivaron rotacionalmente durante 4 días en condiciones de 37 °C y 8 % de CO₂. Se purificó un sobrenadante de cultivo utilizando MabSelect SuRe (Cytiva, 17-5438-02) de acuerdo con un método de rutina. La variante A de IdeZ-variante de Fc humana obtenida se denominó variante A de IdeZ no sialilada-variante de Fc humana.

La variante A de IdeZ sialiladas-variantes de Fc humana obtenidas y la variante A de IdeZ no sialilada-variantes de Fc humana (en adelante, también denominadas simplemente "variantes A de IdeZ-variantes de Fc humana") se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. El perfil electroforético de cada variante A de IdeZ-variante de Fc humana se muestra en la Figura 6.

En la Figura 6, el carril 1 representa el marcador de peso molecular, y los carriles 2 a 5 representan las variantes 7, 8, 17 y 18 de la variante A IdeZ no sialilada-Fc humano, respectivamente. Los carriles 6 a 9 representan las variantes 7, 8, 17 y 18 de la variante A de IdeZ-Fc humano sialilado, respectivamente.

Los resultados obtenidos en condiciones reductoras indicaron que la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 7, 8, 17 o 18 no fue autodigerida. Como se puede observar en los resultados obtenidos en condiciones no reductoras, en todas las variante A de IdeZ-variantes de Fc humana se detectó una banda

derivada del blanco alrededor de 150 kDa del marcador de peso molecular. En la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 8 y en la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 18, se detectó una banda distinta al blanco entre 50 y 75 kDa del marcador de peso molecular. Por el contrario, no se detectó dicha banda en la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 7 y en la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 17. Esto indicó que la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 7 y la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 17 pueden producir el blanco con mayor pureza que la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 8 y la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 18.

Ejemplo 4: Preparación de la variante monovalente IdeZ A-variante de Fc humana

Como se muestra en la Figura 6, se detectó una banda con un peso molecular superior al del blanco como resultado de SDS-PAGE en una condición no reductora. Por lo tanto, se sospechó que la variante A de IdeZ-variantes de Fc humana presentaban agregación. Con el fin de mejorar las propiedades de agregación, se diseñaron secuencias variantes de Fc humana que albergan además mutaciones en la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 7 obtenida en el Ejemplo 3-2, y se diseñó una variante monovalente A de IdeZ-variante de Fc humana que tiene las secuencias variantes de Fc humana. En la Tabla 3 se muestra el nombre de la variante, los nombres de las cadenas constituyentes y las secuencias diseñadas.

Tabla 3

Nombre de la variante	Nombre de la cadena constituyente de la variante	Variación introducida en Fc humana	Aminoácido	ADN
Variante A de IdeZ-variante 19 de Fc humana	Variante A de IdeZ-variante de Fc humana_agujeros	L234A/L235E/G236E/G237V/I253A/E294del/T366S/L368A/Y407V	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 34
	Variante de Fc humana 19_perillas	L234A/L235E/G236E/G237V/I253A/E294del/T366W	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 35

Los ADN que codifican la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 19_agujeros y la variante de Fc humana 19_perillas se sintetizaron de acuerdo con un método de rutina y cada uno se insertó en el vector pcDNA3.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) para preparar cada vector de expresión de cadena constituyente de la variante. Las células se transfectaron con vectores de expresión que codifican B4GALT1 y ST6GAL1, el vector de expresión variante A de IdeZ-variante de Fc humana 19_agujeros y el vector de expresión de la variante de Fc humana 19_perillas, juntos, mediante el método descrito en el Ejemplo 3-1, y se cultivaron. Se purificó un sobrenadante de cultivo utilizando MabSelect SuRe (Cytiva, 17-5438-02) de acuerdo con un método de rutina para obtener la variante A de IdeZ-variante de Fc humana. La proteína obtenida se denominó variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19. Además, las

células ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific Inc.) se transfectaron con el vector de expresión de la variante A de IdeZ-Fc humana variante 19_agujeros y el vector de expresión de Fc humana variante 19_perillas mediante el método descrito en el Ejemplo 3-2, y se cultivaron. Se purificó un sobrenadante de cultivo utilizando MabSelect SuRe (Cytiva, 17-5438-02) de acuerdo con un método de rutina para obtener la

variante A de IdeZ no sialilada-variante de Fc humana 19.

La variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19 obtenida y la variante A de IdeZ no sialilada-variante de Fc humana 19 se analizaron mediante SDS-PAGE en una condición reductora y en una condición no reductora. Cada perfil electroforético se muestra en la Figura 7. En la Figura 7, el carril 1 representa el marcador de peso molecular, el carril 2 representa la variante A de IdeZ no sialilada-variante

19 de Fc humana, y el carril 3 representa la variante A de IdeZ sialilada-variante 19 de Fc humana.

En condiciones reductoras, se detectó una banda presumiblemente derivada de la variante de Fc humana 19_perillas entre 25 y 37 kDa del marcador de peso molecular, y se detectó una banda presumiblemente derivada de la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 19_agujeros entre 50 y 75 kDa del marcador de peso molecular. En condiciones no reductoras, se detectó una banda alrededor de 100

Ejemplo 5: Evaluación de la actividad de escisión de la variante A de IdeZ-variante de Fc humana

A 10 µg de anti-KLH_hlgG1 descrito en el Ejemplo 1, se añadió la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 7 o la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19 en cantidades de 2, 0.4, 0.08 y 0.016 µg (proporciones de concentración final de las cantidades de la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana añadidas a la cantidad de anti-KLH_hlgG1: 0.2, 0.04, 0.008 y 0.0016 veces, respectivamente). El volumen final se fijó en 20 µL y el anticuerpo se hizo reaccionar a 37 °C durante 2 horas. El producto de reacción se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. El perfil electroforético se muestra en la Figura 8.

Como resultado, tanto la variante bivalente A de IdeZ-variante de Fc humana 7 como la variante monovalente A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19 exhibieron una actividad de escisión anti-KLH_hlgG1 casi equivalente.

Ejemplo 6: Análisis de cromatografía de exclusión por tamaño

Para evaluar la pureza después de la purificación por cromatografía de afinidad (purificación utilizando MabSelect SuRe (Cytiva, 17-5438-02)), la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 7 preparada en el Ejemplo 3-2 y la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19 preparada en el Ejemplo 4 se diluyeron cada una a 1 mg/mL y se analizaron utilizando una columna ACQUITY UPLC BEH200 SEC (Waters Corp., #186005225). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Variante A de IdeZ sialilada-variante 7 de Fc humana

Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V s}$)	Área %	Altura (μV)
1.800	560848	6.79	82430
1.864	296574	3.59	73009
1.969	846832	10.25	143426
2.240	6380228	77.24	1301343
2.610	175933	2.13	10160

Variante A de IdeZ sialilada-variante 19 de Fc humana

Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V s}$)	Área %	Altura (μV)
1.794	226510	2.16	30656
1.937	248291	2.37	37410
2.055	857241	8.18	120414
2.265	277238	2.65	56646
2.393	7294906	69.63	1547522
2.633	1307459	12.48	180578
2.814	265092	2.53	40264

Se detectó un pico del blanco en un tiempo de retención de 2.240 minutos para la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 7 y un tiempo de retención de 2.393 minutos para la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19. En la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 7, se detectaron picos de 20.6 % del área en total en tiempos de retención más cortos que el del blanco. Por otra parte, en la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19, se detectaron picos de 15.4 % de área en total en tiempos de retención más cortos que el del blanco. Esto indicó que la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19 tenía un bajo contenido de agregados de alto peso molecular, en comparación con la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 7.

Ejemplo 7: Análisis de las tasas de sialilación de diversas variante A de IdeZ-variantes de Fc humana

La variante A de IdeZ-variantes de Fc humana obtenidas en los Ejemplos 3 y 4 se analizaron para determinar sus tasas de sialilación.

Ejemplo 7-1: Análisis de las tasas de sialilación de variante A de IdeZ sialilada-variantes de Fc humana 5, 6, 9, 10 y 11

La variante A de IdeZ sialiladas-variantes de Fc humana 5, 6, 9, 10 y 11 (en adelante, también denominadas "formas no escindidas") obtenidas en el Ejemplo 3-1 y sus fragmentos formados por autodigestión (en adelante, también denominados "formas escindidas") se analizaron para determinar sus tasas de sialilación. A cada muestra se le añadió ditiotreitól (Thermo Fisher Scientific Inc., A39255; en adelante, "DTT") y se incubó a 37 °C durante 1 hora para reducir un enlace disulfuro intercatenario. La

muestra así reducida se inyectó en un sistema HPLC (Waters Corp.), se separó a través de una columna de fase inversa (Waters Corp., ACQUITY UPLC Protein BEH C4) y luego se introdujo en un espectrómetro de masas (Waters Corp.). Las cadenas de azúcar se atribuyeron a sus respectivos tipos a partir de la diferencia entre un peso molecular teórico y la masa realmente medida después de la reducción, y la proporción (%) de cada cadena de azúcar se calculó a partir de una relación de fuerza iónica. La relación entre una cadena de azúcar a la que se le ha añadido ácido siálico y todas las cadenas de azúcar presentes en la región Fc se definió como la "tasa de sialilación (%)". La tasa de sialilación se calculó de acuerdo con la siguiente expresión.

Tasa de sialilación (%) = (Intensidad total de MS de una cadena H modificada con la cadena de azúcar unida al ácido siálico) / (Intensidad total de MS de todas las cadenas H) × 100.

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

La variante A de IdeZ sialilada-variantes de Fc humana 5, 6, 9, 10 y 11 y sus formas escindidas estaban en su mayoría sialiladas. Estos resultados y los resultados del Ejemplo 3 sugirieron que la autodigestión ocurre durante la expresión o purificación de una manera dependiente de una secuencia en lugar de la presencia o ausencia de sialilación para las variantes A de IdeZ sialiladas-variantes de Fc humanas 5, 6, 9, 10 y 11.

Tabla 5

Nombre de la variante	Tasa de sialilación de la forma no escindida (%)	Tasa de sialilación de la forma escindida (%)
Variante A de IdeZ sialilada-variante 5 de Fc humana	89.7	94.9
Variante A de IdeZ sialilada-variante 6 de Fc humana	87.3	94.3
Variante A de IdeZ sialilada-variante 9 de Fc humana	84.4	76.4
Variante A de IdeZ sialilada-variante 10 de Fc humana	93.2	95.6
Variante A de IdeZ sialilada-variante 11 de Fc humana	No se detectó la forma no escindida	77.1

Ejemplo 7-2: Análisis de las tasas de sialilación de variante A de IdeZ-variantes de Fc humana 7, 8, 17 y 18

La variante A IdeZ-variantes de Fc humana 7, 8, 17 y 18 obtenidas en el Ejemplo 3-2 se analizaron para determinar sus tasas de sialilación mediante el método descrito en el Ejemplo 7-1. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Como resultado, se encontró que la variante A de IdeZ-variantes de Fc humana 7, 8, 17 y 18 estaban mayoritariamente sialiladas por coexpresión con la glicosiltransferasa B4GALT1 y ST6GAL1.

Tabla 6

Nombre de la variante	Tasa de sialilación (%)
Variante A de IdeZ sialilada-variante 7 de Fc humana	94.5
Variante A de IdeZ no sialilada-variante 7 de Fc humana	3.7
Variante A de IdeZ sialilada-variante 8 de Fc humana	85.3
Variante A de IdeZ no sialilada-variante 8 de Fc humana	0.7
Variante A de IdeZ sialilada-variante 17 de Fc humana	69.2
Variante A de IdeZ no sialilada-variante 17 de Fc humana	0.4
Variante A de IdeZ sialilada-variante 18 de Fc humana	80.5
Variante A de IdeZ no sialilada-variante 18 de Fc humana	0.7

Ejemplo 7-3: Análisis de la tasa de sialilación de la variante A de IdeZ-variante 19 de Fc humana

La variante A de IdeZ-variante de Fc humana 19 obtenida en el Ejemplo 4 se analizó para determinar su tasa de sialilación mediante el método descrito en el Ejemplo 7-1. La variante A de IdeZ-variante de Fc humana 19 se separó en la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 19_agujeros y la variante de Fc humana 19_perillas mediante un tratamiento de reducción, y cada fragmento se observó con un peso molecular distintivo en la espectrometría de masas. Por lo tanto, se calcularon sus respectivas tasas de sialilación. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Como resultado, se encontró que ambos fragmentos de la variante A de IdeZ sialilada-variante de Fc humana 19 estaban mayoritariamente sialilados por coexpresión con la glicosiltransferasa B4GALT1 y ST6GAL1. Sorprendentemente, las tasas de sialilación fueron relativamente altas sin coexpresión con la glicosiltransferasa, en comparación con la variante A de IdeZ no sialilada bivalente-variante de Fc humana 7.

Tabla 7

Nombre de la variante	Tasa de sialilación de la variante de Fc humana 19_perillas (%)	Tasa de sialilación de la variante A de IdeZ-variante de Fc humana 19_agujeros (%)
Variante A de IdeZ sialilada-variante 19 de Fc humana	97.1	97.4
Variante A de IdeZ no sialilada-variante 19 de Fc humana	60.3	27.9

Para evaluar si el patrón de enlace del ácido siálico diferiría dependiendo de la presencia o ausencia de coexpresión con la glicosiltransferasa, se realizó un análisis mediante el método RapiFluor. Se escindió una cadena de azúcar de la muestra utilizando el kit GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan-96 Sample (Waters Corp., 176003606; en adelante, denominado "Kit") de acuerdo con el protocolo del Kit y se marcó con un colorante fluorescente. La muestra marcada se inyectó en un sistema HPLC (Waters

Corp.), se separó a través de una columna HILIC (Waters Corp., ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide) y luego se introdujo en un espectrómetro de masas (Waters Corp.) y un detector de fluorescencia (Waters Corp.).

Las cadenas de azúcar, incluidos sus patrones de enlace, se atribuyeron mediante la comparación entre un peso molecular teórico y la masa realmente medida y la comparación entre el tiempo de retención de RapiFluor-MS Dextran Calibration Ladder (Waters Corp., 186007982) inyectado por separado como muestra y el tiempo de retención realmente medido. La relación del patrón de enlace (%) de una cadena de azúcar sialilada típica FA2G2S2 (notación Oxford) se calculó a partir de un valor de área de pico obtenido con el detector de fluorescencia. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Estos resultados indicaron que un enlace α -2,3 no humano es preferencial en ausencia de coexpresión con la glicosiltransferasa, mientras que un enlace α -2,6 es preferencial en presencia de coexpresión con la glicosiltransferasa. Esto sugirió que la coexpresión con la glicosiltransferasa es efectiva para la preparación de una región Fc sialilada utilizando células CHO.

Tabla 8

Nombre de la variante	Relación de enlace α -2,3 de FA2G2S2 (%)	Relación de enlace α -2,6 de FA2G2S2 (%)
Variante A de IdeZ sialilada-variante 19 de Fc humana	15	85
Variante A de IdeZ no sialilada-variante 19 de Fc humana	100	No detectado

Las secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN de los polipéptidos de acuerdo con una modalidad se muestran en las siguientes tablas.

35
30
25
20
15
10
5

Tabla 9-1
Tabla 9

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia	Organismo del que se deriva la secuencia	ADN/proteína	Información de secuencia
1	Proteína IdeZ	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	Proteína	MKTIAYPNKPHSLSAGLLTAIAIFSLASNITYADDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTP LTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIE AYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVL DMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDIS TIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGLNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVG INAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS
2	Proteína IdeZ de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	ADN	GACGACTACCAGAGAAACGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACCTGGTGGTTCGACCAGAACAAGACCGAGATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTAACCTGTCTGCTAGACAGCTGGGCGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACATG TTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGGC CTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAAGAGGCG ATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGACAT CTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACAC CTACGCCAACGTGTCCATCAGCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGCC GAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCAACGCCTCCATCGGC ATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCTCACGGCCATGTGGCCATCTCCGCCAAGA AGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCG GCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCC

35
30
25
20
15
10
5

Tabla 9-2
Tabla 9 (continuación)

3	Proteína IdeZ de fusión IdeZ de tipo silvestre-Fc de ratón	<i>Streptococcus</i> <i>equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWG ADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSG KDIWQKLS
4	Variante de IdeZ proteína de fusión variante A de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus</i> <i>equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	ADN	GACGACTACCAGAGAAACGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCGGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCC

35
30
25
20
15
10
5

Tabla 9-3
Tabla 9 (continuación)

5	Variante de IdeZ proteína de fusión variante A de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKEEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPGLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVRISHVINLWG ADFNAEGNLEAIYVTDSDADASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSG KDIWQKLS
6	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 1 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	ADN	GACGACTACCAGAGAAACGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTCGACCAGAACAAAacGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACCC CGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCATC GACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGCCT TTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACATGTT CATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGGCCT TACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCCAGAGGCGAT CAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGACATC TCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACACCT ATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGCCG AGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGGCA TGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAGAA GATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCCGG CAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCC

35
30
25
20
15
10
5

Tabla 9-4
Tabla 9 (continuación)

7	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 1 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPGLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVRISHVINLWG ADFNAEGNLEAIYVTDSDADASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSG KDIWQKLS
8	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 2 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	ADN	GACGACTACCAGAGAAACGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTaaCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACATG TTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGGC CTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACACGAGGGCG ATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGACAT CTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACAC CTATGCCAACGTGCGGATCTCCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGCC GAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGGC ATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAGA AGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCCG GCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCC

35
30
25
20
15
10
5

Tabla 9-5
Tabla 9 (continuación)

9	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 2 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKEEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVRISHVINLWG ADFNAEGNLEAIYVTDSDADASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSG KDIWQKLS
10	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 3 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	ADN	GACGACTACCAGAGAAACGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGGTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGtGATCTCCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGCC GAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGGC ATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAGA AGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCCG GCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCC

Tabla 9-6

Tabla 9 (continuación)

11	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 3 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKEEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPGLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWG ADFNAEGNLEAIYVTDSDADASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSG KDIWQKLS
12	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 4 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	ADN	GACGACTACCAGAGAAACGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGGTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCaATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCC

35
30
25
20
15
10
5

Tabla 9-7
Tabla 9 (continuación)

13	Variante de IdeZ proteína de fusión variante 4 de IdeZ-Fc de ratón	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i>	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKEEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFPGLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVRISHVINLWG ADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSG KDIWQKLS
14	Variante A de IdeZ- variante 5 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANV _r ISHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDA _d ASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCPPCPAPNAEGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDS _d GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV _f FSCSV _m MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	Variante A de IdeZ- variante 6 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANV _r ISHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDA _d ASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCHKCPAPNAEGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDS _d GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV _f FSCSV _m MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tabla 9-8

Tabla 9 (continuación)

16	Variante A de IdeZ- variante 7 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVriSHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDAdASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCPPCPAPEAEVPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	Variante A de IdeZ- variante 8 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVriSHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDAdASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCHKCPAPNAEEVSSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18	Variante A de IdeZ- variante 9 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVriSHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDAdASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCPPCPAPEAEGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREQANSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tabla 9-9

Tabla 9 (continuación)

19	Variante A de IdeZ- variante 10 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVrISHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDAdASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCPPCPAPEAEGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	Variante A de IdeZ- variante 11 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVrISHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDAdASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCPPCPAPNAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREQANSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21	Variante A de IdeZ- variante 17 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVrISHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDAdASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCPPCPAPEAEVPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREQANSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Tabla 9-10

Tabla 9 (continuación)

22	Variante A de IdeZ- variante 18 de Fc humana	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANV _r ISHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDA _d ASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCHKCPAPNAEEVSSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREQANSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	Variante A de IdeZ- variante 19 de Fc humana_ag ujeros	Construcción sintética	Proteína	DDYQRNAAEVYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKVF DGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNK _e EIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQ TNSQLFNYFRDKAFP _g LSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANV _r ISHVINLWGA DFNAEGNLEAIYVTDSDA _d ASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGK DIWQKLSDKTHTCPPCAPEAEEVPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	Variante de Fc humana 19_perillas	Construcción sintética	Proteína	CPPCAPEAEEVPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 30 25 20 15 10 5

Tabla 9-11

Tabla 9 (continuación)

25	Variante A de IdeZ- variante 5 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG CTCCTAATGCTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCAATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	---	---------------------------	-----	---

Tabla 9-12

Tabla 9 (continuación)

26	Variante A de IdeZ- variante 6 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCACAAGTGCCCT GCTCCTAATGCTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACA CCCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACG AGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCA AGACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCAATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	---	---------------------------	-----	---

Tabla 9-13

Tabla 9 (continuación)

27	Variante A de IdeZ- variante 7 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG CTCCAGAGGCTGAAGAGGTGCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	---	---------------------------	-----	--

Tabla 9-14

Tabla 9 (continuación)

28	Variante A de IdeZ- variante 8 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCACAAGTGCCCT GCTCCTAACGCCGAAGAGGTGTCCTCCGTGTTTCTGTTCCCTCAAAGCCTAAGGACA CCCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACG AGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCA AGACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCAATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	---	------------------------	-----	---

Tabla 9-15

Tabla 9 (continuación)

29	Variante A de IdeZ- variante 9 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG CTCCAGAAGCTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAGGCCAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCTGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCACCTTCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	---	------------------------	-----	---

Tabla 9-16

Tabla 9 (continuación)

30	Variante A de IdeZ- variante 10 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGGTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG CTCCAGAAGCTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCACCTTCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	--	------------------------	-----	---

35 30 25 20 15 10 5

Tabla 9-17

Tabla 9 (continuación)

31	Variante A de IdeZ- variante 11 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG CTCCTAATGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAGGCCAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCTGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCAATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCACCTTCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTT TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	--	---------------------------	-----	---

Tabla 9-18

Tabla 9 (continuación)

32	Variante A de IdeZ- variante 17 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCCACGGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG CTCCAGAGGCTGAAGAGGTGCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAG_{gcc}AACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCC CTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC CAGGTTTACACCTTGCCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGG CCAGCCAGAGAACAATAACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC TTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT CCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCT GTCCCCTGGCAAG
----	--	------------------------	-----	--

Tabla 9-19

Tabla 9 (continuación)

33	Variante A de IdeZ- variante 18 de Fc humana	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCACAAGTGCCCT GCTCCTAACGCCGAAGAGGTGTCCTCCGTGTTTCTGTTCCCTCAAAGCCTAAGGACA CCCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACG AGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCA AGACCAAGCCTAGAGAGCAG_{gcc}AACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCAATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATG GCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTC TGTCCCCTGGCAAG
----	--	------------------------	-----	--

Tabla 9-20

Tabla 9 (continuación)

34	Variante A de IdeZ- variante 19 de Fc humana_ag ujeros	Construcción sintética	ADN	GACGACTACCAGAGAAATGCCGCCGAGGTGTACGCCAAAGAGGTGCCACATCAGATC ACCTCCGTGTGGACCAAGGGCGTGACACCTCTGACACCCGAGCAGTTCCGGTACAAC AACGAGGATGTGATCCACGCTCCTTACCTGGCTCACCAAGGATGGTACGACATCACCA AGGTGTTTCGACGGCAAGGACAACCTGCTGTGTGGCGCTGCTACCGCCGGCAATATGC TGCACTGGTGGTTTCGACCAGAACAAAGAGGAAATCGAGGCCTACCTGAGCAAGCACC CCGAGAAGCAGAAGATCATCTTCAACAATCAAGAGCTGTTTCGACCTGAAGGCCGCCAT CGACACCAAGGACTCCCAGACCAACAGCCAGCTGTTCAACTACTTCCGCGACAAGGC CTTTCCTGGCCTGTCCGCTAGACAGCTGGGAGTGATGCCTGACCTGGTGCTGGACAT GTTTCATCAACGGCTACTACCTGAACGTGTTCAAGACCCAGTCCACCGACGTGAACCGG CCTTACCAGGACAAGGATAAGAGAGGCGGCATCTTCGACGCCGTGTTACCAGAGGC GATCAGACCACACTGCTGACCGCCAGACACGATCTGAAGAACAAGGGCCTGAACGAC ATCTCCACCATCATCAAGCAAGAGCTGACCGAGGGCAGAGCCCTGGCTCTGTCTCACA CCTATGCCAACGTGCGGATCTCCACGTGATCAACCTGTGGGGCGCTGACTTTAACGC CGAGGGCAATCTGGAAGCCATCTACGTGACCGACTCTGACGCCGATGCCTCCATCGG CATGAAGAAATACTTCGTGGGCATCAACGCCACGCCATGTGGCCATCTCTGCCAAG AAGATCGAGGGCGAGAATATCGGCGCTCAGGTGCTGGGCCTGTTACCCTGAGTTCC GGCAAGGATATCTGGCAGAAGCTGTCCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTG CTCCAGAGGCTGAAGAGGTCCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC CCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACC CCAGGTTTACACCTTGCCACCTTCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG TCTTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGAGCAATG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT CTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCTGTCT CTGTCCCCTGGCAAG
----	--	------------------------	-----	---

35 30 25 20 15 10 5

Tabla 9-21

Tabla 9 (continuación)

35	Variante de Fc humana 19_perillas	Construcción sintética	ADN	TGTCTCCATGTCCTGCACCTGAGGCTGAAGAGGTGCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCTC CAAAGCCTAAGGACACCCTGATGGCCTCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGTGGTGG TGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGG CCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG GAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGG ACTCCGACGGCTCATTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCA GCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG
----	---	---------------------------	-----	---

Aunque anteriormente se describen algunas modalidades de la presente invención, estas modalidades se presentan como ejemplos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Estas nuevas modalidades pueden llevarse a cabo en otras formas diversas, y pueden realizarse en ellas diversas omisiones, sustituciones y cambios o modificaciones sin alejarse de la esencia de la invención. Estas modalidades o sus modificaciones están incluidas en el alcance y la esencia de la invención y también están incluidas en el alcance de los aspectos de la invención descritos en las reivindicaciones y un alcance equivalente al mismo.

Aplicabilidad industrial

La variante de IdeZ de la presente invención y un polipéptido y similares que comprenden la variante de IdeZ tienen una actividad de proteasa favorable incluso cuando se producen utilizando células de mamíferos, y son útiles para el pretratamiento de la terapia génica utilizando AAV y la prevención o el tratamiento del rechazo en trasplantes, enfermedades autoinmunes y similares.