

REIVINDICACIONES

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 la reivindicación 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.
3. La variante de IdeZ de acuerdo con la reivindicación 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 las reivindicaciones 1 a 3, en donde la variante de IdeZ tiene (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 la reivindicación 4, en donde 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;

(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 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 la reivindicación 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 la reivindicación 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 la reivindicación 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 las reivindicaciones 1 a 8.

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

12. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 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 las reivindicaciones 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 la reivindicación 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 la reivindicación 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 la reivindicación 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 la reivindicación 16, en donde la región Fc se selecciona entre las 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,
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 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.

18. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 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: 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 las reivindicaciones 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 proteínas de fusión forman un dímero.

20. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 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 la reivindicación 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)

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)

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 las reivindicaciones 19 a 21, en donde, 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 las reivindicaciones 9 a 22.

24. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 23.

25. Una célula hospedera transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 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 la reivindicación 25.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 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,

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 la reivindicación 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. La variante de la región Fc de acuerdo con la reivindicación 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.

31. La variante de la región Fc de acuerdo con la reivindicación 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 la reivindicación 31, en donde la variante de la región Fc se selecciona entre las siguientes variantes de la región 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.

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

34. La variante de la región Fc de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la región Fc se deriva de Ig γ 1 humana, Ig γ 2 humana, Ig γ 3 humana o Ig γ 4 humana.

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

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

37. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 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 la reivindicación 37, en donde la proteína de fusión 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: 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.