

POLIPÉPTIDO DE FRAGMENTO Fc PARA PRODUCIR POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN Y CONJUGADOS TERAPÉUTICAMENTE ACTIVOS

CAMPO DE LA INVENCION

Se ha descubierto que es posible modificar la unión de un anticuerpo o construcción de fusión basada en un polipéptido de fragmento Fc a FcRn y Fc γ Rs cambiando los residuos de aminoácidos en el polipéptido de fragmento Fc. Los conjugados y los constructos de fusión basados en los polipéptidos de la región Fc descritos en este documento se pueden utilizar, por ejemplo, para tratar enfermedades que requieren tiempos de retención específicamente seleccionados para la administración sistémica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los receptores del dominio Fc de la inmunoglobulina (FcR) se dividen en dos clases principales: los que participan en funciones efectoras, tales como los FcR para IgG (Fc RI, II y III), IgE (Fc RI) e IgA (Fc α RI), y los que son responsables del transporte de inmunoglobulinas a través de las superficies epiteliales, en concreto, el receptor polimérico IgA (pIgR) y FcRn, el transportador de IgG neonatal.

El receptor Fc neonatal (FcRn) es importante para la vía metabólica de los anticuerpos IgG *in vivo*. La función del FcRn es rescatar a la IgG de tipo salvaje del proceso de degradación lisosomal, lo que produce una reducción de la depuración y un aumento de la vida media de la inmunoglobulina. El receptor Fc neonatal es una proteína heterodimérica que consta de dos polipéptidos: una proteína similar al complejo principal de histocompatibilidad de clase I de 50 kDa (α -FcRn) y una β 2-microglobulina (β 2m) de 15 kDa. El

FcRn se une con alta afinidad a la porción CH₂-CH₃ de la región Fc del anticuerpo IgG. La interacción entre un anticuerpo de clase IgG y FcRn depende del pH y se produce en una proporción estequiométrica de 1:2, es decir, una molécula de anticuerpo IgG puede interactuar con dos moléculas de FcRn a través de sus dos polipéptidos de la región Fc de cadena pesada (*véase, por ejemplo*, HUBER A.H., et al., "Crystallization and stoichiometry of binding of a complex between a rat intestinal Fc receptor y Fc" (*Cristalización y estequiometría de la unión de un complejo entre un receptor Fc intestinal de rata y Fc*), Journal of molecular biology, 1993, V. 230, N. 3, p.1077-1083).

Por lo tanto, las propiedades y las características de unión de las moléculas IgG con relación a FcRn *in vitro* son indicativas de su farmacocinética *in vivo* en sangre.

El fragmento Fc del anticuerpo también interactúa con varios receptores y ligandos Fc que median las funciones efectoras de las células inmunitarias. Esta familia de receptores incluye Fc-gamma RI (CD64), incluidas las isoformas: Fc-gamma RIa, Fc-gamma RIb y Fc-gamma RIc; Fc-gamma RII (CD32), incluidas las isoformas: Fc-gamma RIIa, Fc-gamma RIIb (incluidas Fc-gamma RIIb-1 y Fc-gamma RIIb-2) y Fc-gamma RIIC; y Fc-gamma RIII (CD16), incluidas las isoformas Fc-gamma RIIIa y Fc-gamma RIIIb (*véase* NAGELKERKE SQ, KUIJPERS TW, "Immunomodulation by IVIg y the role of Fc-gamma receptors: classic mechanisms of action after all?" (*Inmunomodulación por IgIV y el papel de los receptores Fc-gamma: ¿mecanismos de acción clásicos al fin y al cabo?*) Frontiers in immunology, 2015, V. 5, p.674).

Se sabe que los receptores Fc-gamma tienen el dominio extracelular que media la interacción con Fc, la región unida a la membrana y el dominio intracelular que puede mediar algunos eventos de señalización dentro de una célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunitarias,

incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T. La formación del complejo Fc/Fc-gamma-R media las interacciones de estas células efectoras con antígenos, lo que generalmente da como resultado la señalización celular y respuestas inmunológicas posteriores importantes, tales como la liberación de mediadores inflamatorios, la activación de células B, la endocitosis, la fagocitosis y la citotoxicidad anticuerpo-dependiente. La capacidad de mediar la función efectora fagotóxica es un mecanismo potencial para ejercer la defensa antiinfecciosa de los anticuerpos (véase NAGELKERKE S. Q., KUIJPERS T. W., Immunomodulation by IVIg y the role of Fc-gamma receptors: classic mechanisms of action after all?, *Frontiers in immunology*, (*Inmunomodulación por IgIV y el papel de los receptores Fc-gamma: ¿mecanismos de acción clásicos al fin y al cabo?*)), *Frontiers in immunology*, 2015, V. 5, p. 674).

La interacción entre FcRn y la región Fc del anticuerpo IgG involucra varios residuos de aminoácidos de los dominios CH2 y CH3 de cadena pesada. Los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción con FcRn se localizan comenzando desde aproximadamente la posición 243 según la numeración de la UE hasta la posición 261 según la numeración de la UE, desde aproximadamente la posición 275 según la numeración de la UE hasta la posición 293 según la numeración de la UE, desde aproximadamente la posición 302 según la numeración de la UE hasta la posición 319 según la numeración de la UE, desde aproximadamente la posición 336 según la numeración de la UE hasta la posición 348 según la numeración de la UE, en la posición 408 según la numeración de la UE, y desde aproximadamente la posición 424 según la numeración de la UE hasta la posición 440 según la numeración de la UE. Más específicamente, los siguientes residuos de aminoácidos según la numeración de la UE de Kabat intervienen en la región Fc y la interacción FcRn: F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250,

L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439, y S440.

Las investigaciones que utilizan mutagénesis dirigida al sitio mostraron que los sitios críticos para la unión a FcRn dentro de la región Fc de IgG son la histidina 310, la histidina 435 y la isoleucina 253; y, en menor medida, histidina 433 y tirosina 436 (*véanse , por ejemplo*, KIM JK et al., “Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I - related receptor, FcRn”, European journal of immunology, 1999, V. 29, N. 9, p.2819-2825 ; RAGHAVAN M. et al., “Analysis of the pH dependent of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody y receptor variants”, Biochemistry, 1995, V. 34, N. 45, p.14649-14657 ; MEDESAN C. et al., “Delineation of the amino acid wastes involved in transcytosis y catabolism of mouse IgG1”, The Journal of Immunology, 1997, V. 158, N. 5, (pág..2211-2217).

Se conocen métodos para mejorar la unión de IgG a FcRn que se lograron mediante la mutación de varios residuos de aminoácidos dentro de IgG: treonina 250, metionina 252, serina 254, treonina 256, treonina 307, ácido glutámico 380, metionina 428, histidina 433 y asparagina 434 (*ver, por ejemplo*, KUO T. T. et al., Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics, Journal of clinical immunology, 2010, V. 30, N. 6, p.777-789).

Los estudios de las interacciones entre inmunoglobulinas y $\text{Fc}\gamma\text{R}$ revelaron que los sitios de unión para C1q y $\text{Fc}\gamma\text{R}$ se encuentran dentro del dominio CH2 de IgG. Un análisis de mutagénesis del mAb IgG2b identificó ácido glutámico, lisina y residuos de lisina en las posiciones 318, 320 y 322, respectivamente, como motivos de unión esenciales para C1q. Además, los residuos de aminoácidos en las posiciones 234-238 intervienen en la interacción de alta afinidad de IgG2a de ratón con Fc RI. Asimismo, se ha demostrado que la sustitución del ácido aspártico por alanina en la posición 265 (D265A) elimina la interacción de la IgG1 de ratón con los Fc RIIf y Fc RIIf de baja afinidad (BAUDINO L. et al., Crucial role of aspartic acid at position 265 in the CH2 domain for murine IgG2a y IgG2b Fc-associated effector functions, The Journal of Immunology, 2008, V. 181, N. 9, p.6664-6669).

Por lo tanto, para algunas aplicaciones terapéuticas, es conveniente evitar la activación del complemento y de los receptores $\text{Fc}\gamma\text{R}$. Por ejemplo, no es deseable estimular el complemento cuando se administran polipéptidos terapéuticamente activos fusionados a fragmentos Fc de anticuerpos (véase , *por ejemplo* , CAPON DJ et al., Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy (*Diseño de inmunoadesinas CD4 para la terapia del SIDA*), Nature, 1989, V. 337, N. 6207, p. 525-531). Además, debido a la afinidad relativamente menor de la IgG2 e IgG4 humana por los receptores $\text{Fc}\gamma\text{R}$ y los receptores de complemento (en BRUHNS P. et al., "Specificity y affinity of human $\text{Fc}\gamma$ receptors y their polymorphic variants for human IgG subclasses," (*Especificidad y afinidad de los receptores $\text{Fc}\gamma$ humanos y sus variantes polimórficas para las subclases de IgG humana*), Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2009, V. 113, N. 16, p.3716-3725), estas dos subclases se utilizan en el desarrollo de anticuerpos monoclonales terapéuticos (monoclonal antibodies, mAb) (por ejemplo, denosumab, natalizumab, panitumumab y eculizumab), en casos en los que se requiere su mínimo efector potencial.

Así, por ejemplo, el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) se fusionó con IgG2 humana para evitar una inmunogenicidad no deseada, y demostró que tiene propiedades terapéuticas y farmacológicas superiores en comparación con el GLP-1 nativo en un modelo de un ratón con diabetes tipo I (WANG Q. et al., Novel GLP-1 fusion chimera as potent long performing GLP-1 receptor agonist (*Nueva quimera de fusión de GLP-1 como potente agonista del receptor de GLP-1 de acción prolongada*), PloS one, 2010, V. 5, N. 9, p.e12734). Sin embargo, también es posible causar una disminución de la función efectora de un sistema efector activando simultáneamente otro sistema efector. En particular, se observó que la activación de los mastocitos mediante FcεR puede suprimirse mediante la activación simultánea del inhibidor FcγRIIb (DAËRON M. et al., The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, y FcR-dependent cell activation (*El mismo motivo de inhibición basado en tirosina, en el dominio intracitoplasmático de FcγRIIB, regula negativamente la activación celular dependiente de BCR, TCR y FcR.*), Immunity, 1995, V. 3, N. 5, p.635-646), lo que ha estimulado el desarrollo de varias proteínas de fusión Fc que inhiben la inflamación y son útiles en el tratamiento del asma alérgico.

En resumen, se puede suponer que introducir ciertas modificaciones en el fragmento Fc al que está fusionado o con el que está conjugado un socio biológicamente activo puede mejorar la capacidad de unión de la proteína de fusión a FcRn y reducir su capacidad de unión a los efectores FcγR, y esto puede mejorar significativamente las propiedades farmacocinéticas de la proteína de fusión.

La presente invención se refiere a la generación de polipéptidos de fragmentos Fc de inmunoglobulina que tienen una alta capacidad de unión a FcRn y una baja capacidad de unión a FcγRs, para su uso en la creación de polipéptidos de fusión y conjugados terapéuticamente activos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Todos los términos y abreviaturas utilizados en esta solicitud tienen los mismos significados que aquellos generalmente aceptados en la técnica y que resultan evidentes para los expertos en la materia.

El término "alteración" significa una mutación (sustitución), inserción (adición) o supresión de uno o más residuos de aminoácidos en un anticuerpo parental o polipéptido de fusión, *por ejemplo*, un polipéptido de fusión que comprende al menos una porción de unión a FcRn de una región Fc, dando como resultado dicha(s) alteración(es) la producción de un anticuerpo o polipéptido de fusión modificado. El término "mutación" significa que un determinado residuo de aminoácido es reemplazado por otro residuo de aminoácido. Por ejemplo, la mutación L234A significa que el residuo de aminoácido lisina en la posición 234 en la región Fc del anticuerpo (polipéptido) es sustituido por el residuo de aminoácido alanina (sustitución de lisina por alanina) (la numeración corresponde al índice de la UE).

El término "mutación de aminoácido" significa la sustitución de al menos un residuo de aminoácido existente por otro residuo de aminoácido diferente (es decir, un residuo de aminoácido sustituto). El residuo de aminoácido sustituyente puede ser un "residuo de aminoácido natural" seleccionado del grupo que consiste en alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V). El residuo de aminoácido sustituto puede ser un "residuo de aminoácido no natural", incluido, entre otros, un estereoisómero D de un "residuo de aminoácido natural".

El término "inserción de aminoácidos" significa la inserción (adicional) de al menos un residuo de aminoácido en una posición predeterminada en una secuencia de aminoácidos. En una realización de la presente invención, una "inserción" es la inserción de uno, dos, tres o más residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos insertados pueden ser cualquier residuo de aminoácido natural o no natural, o una combinación de los mismos.

El término "eliminación de aminoácidos" significa la eliminación de al menos un residuo de aminoácido de una posición predeterminada en una secuencia de aminoácidos.

El término "dominio CH2" significa la porción de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo que se extiende desde aproximadamente la posición 231 según la numeración de la UE hasta la posición 340 según la numeración de la UE (sistema de numeración de la UE de Kabat).

El término "dominio CH3" significa la porción de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo que se extiende desde aproximadamente la posición 341 según la numeración de la UE hasta la posición 446 según la numeración de la UE.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de su dominio constante de cadena pesada o región constante. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden subdividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada correspondientes a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "derivado de" significa que una secuencia de aminoácidos se produce a partir de una secuencia de aminoácidos parental mediante la introducción de cambios en al menos una posición. Dicha secuencia de

aminoácidos alterada difiere de la secuencia parental de aminoácidos correspondiente, al menos en una posición correspondiente (el esquema de numeración para las regiones Fc de los anticuerpos se realiza de acuerdo con el sistema de numeración del índice EU de Kabat). En una de las realizaciones, la secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia parental de aminoácidos difiere en uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes. De manera similar, la secuencia de aminoácidos alterada tiene una alta identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos parental. En una de las realizaciones, la secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de aminoácidos parental tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 90 % o más. En una de las realizaciones, la secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de aminoácidos parental tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 95 % o más.

Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana, o que se origina a partir de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Esta definición de "anticuerpo humano" excluye específicamente un anticuerpo humanizado que contiene residuos de unión a antígenos que no se encuentran en un anticuerpo humano.

El término "un fragmento Fc derivado de humano" significa la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de humano, que comprende al menos una porción de la región bisagra, los dominios CH2 y CH3. En una de las realizaciones, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde aproximadamente Cys226 o Pro230 hasta el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. El residuo de lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos de

aminoácidos en la región Fc o región constante sigue el esquema de numeración de la UE, también denominado índice de la UE, como se describe en KABAT E.A., Sequences of proteínas of immunological interest, US Department of Health y Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health (*Secuencias de proteínas de interés inmunológico, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud,*), 1991, N. 91 . La región Fc consta de dos polipéptidos de la región Fc de cadena pesada que pueden unirse covalentemente entre sí a través de las cisteínas de la región bisagra que participan en la formación de enlaces disulfuro entre los polipéptidos.

El término "FcRn" significa receptor Fc neonatal humano. La función del receptor FcRn es rescatar a la IgG de la vía de degradación lisosomal, lo que resulta en una reducción de la depuración y un aumento de la vida media. FcRn es una proteína heterodimérica que consta de dos polipéptidos: una proteína similar al complejo principal de histocompatibilidad clase I de 50 kDa (α -FcRn) y una β 2-microglobulina (β 2m) de 15 kDa. FcRn se une con alta afinidad a la porción CH2-CH3 de la región Fc de IgG. La interacción entre IgG y FcRn es estrictamente dependiente del pH y ocurre en una proporción estequiométrica de 1:2, donde una molécula de IgG se une a dos moléculas de FcRn a través de sus dos cadenas pesadas (HUBER AH et al., Crystallization y stoichiometry of binding of a complex between a rat intestinal Fc receptor y Fc (*Cristalización y estequiometría de la unión de un complejo entre un receptor Fc intestinal de rata y Fc*), Journal of molecular biology, 1993, V. 230, N. 3, p.1077-1083). La unión de FcRn se produce en el endosoma a un pH ácido ($\text{pH} < 6,5$), y la IgG se libera en la superficie celular a un pH neutro ($\text{pH} \sim 7,4$). La naturaleza dependiente del pH de esta interacción facilita la protección mediada por FcRn de las moléculas de IgG que entran en las células a través de la pinocitosis contra la degradación intracelular a través de la unión al receptor en condiciones ácidas dentro de los endosomas. Además, FcRn promueve el retorno de IgG a la superficie celular y su posterior liberación al torrente

sanguíneo tras la exposición del complejo FcRn-IgG a un entorno de pH neutro fuera de la célula.

El término "porción de unión a FcRn de la región Fc" significa una porción de un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo, que se extiende desde aproximadamente la posición 243 según la numeración de la UE hasta la posición 261 según la numeración de la UE, y desde aproximadamente la posición 275 según la numeración de la UE hasta la posición 293 según la numeración de la UE, y desde aproximadamente la posición 302 según la numeración de la UE hasta la posición 319 según la numeración de la UE, y desde aproximadamente la posición 336 según la numeración de la UE hasta la posición 348 según la numeración de la UE, y desde aproximadamente la posición 367 según la numeración de la UE hasta la posición 393 según la numeración de la UE y la posición 408 según la numeración de la UE, y desde aproximadamente la posición 424 según la numeración de la UE hasta la posición 440 según la numeración de la UE. En una de las realizaciones, se cambian uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos según la numeración UE de Kabat: F243, P244, P245 P, K246, P247, K248, D249, T250, L251, M252, I253, S254, R255, T256, P257, E258, V259, T260, C261, F275, N276, W277, Y278, V279, D280, V282, E283, V284, H285, N286, A287, K288, T289, K290, P291, R292, E293, V302, V303, S304, V305, L306, T307, V308, L309, H310, Q311, D312, W313, L314, N315, G316, K317, E318, Y319, I336, S337, K338, A339, K340, G341, Q342, P343, R344, E345, P346, Q347, V348, C367, V369, F372, Y373, P374, S375, D376, I377, A378, V379, E380, W381, E382, S383, N384, G385, Q386, P387, E388, N389, Y391, T393, S408, S424, C425, S426, V427, M428, H429, E430, A431, L432, H433, N434, H435, Y436, T437, Q438, K439 y S440 (numeración de la UE).

El término "un polipéptido de fragmento Fc de IgG humana" se refiere a una secuencia de aminoácidos resultante de al menos una alteración de

aminoácidos dentro de un polipéptido de la región Fc nativa de una IgG humana, o un polipéptido de la región Fc de una IgG humana de tipo salvaje.

Los términos “heterodímero” o “heterodimérico” significan una molécula que comprende dos cadenas polipeptídicas (por ejemplo, que tienen longitudes comparables), en donde las dos cadenas polipeptídicas tienen secuencias de aminoácidos que difieren en al menos un residuo de aminoácido en posiciones coincidentes, en donde la posición coincidente se define de acuerdo con el índice EU de Kabat.

Los términos “homodímero” y “homodimérico” significan una molécula que comprende dos cadenas polipeptídicas de longitudes comparables, en donde las dos cadenas polipeptídicas tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas en posiciones coincidentes, en donde las posiciones coincidentes se definen de acuerdo con el índice EU de Kabat.

Un “individuo” o un “sujeto” se refiere a un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales domésticos (por ejemplo, bovinos, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tal como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En algunas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un ácido nucleico “aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de los componentes de su entorno natural. El “ácido nucleico aislado” incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente contienen una molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico existe fuera de un cromosoma o en una ubicación en un cromosoma que es diferente de su ubicación natural en el cromosoma.

Según la presente invención, se debe entender por “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” una molécula de polinucleótido, que puede ser de

tipo ADN o ARN, preferentemente de tipo ADN, y, en particular, puede ser de doble cadena. Puede ser de origen natural o sintético. Los ácidos nucleicos sintéticos se generan *in vitro*. Ejemplos de tales ácidos nucleicos sintéticos son aquellos en los que los codones que codifican un polipéptido(s), en particular, el polipéptido de fragmento Fc de la invención, se han optimizado de acuerdo con el organismo huésped en el que se va a expresar (por ejemplo, reemplazando los codones por más codones o por los más preferidos en función de las tablas de frecuencia de uso de codones para un organismo huésped similar, o para el grupo al que pertenece el organismo huésped similar, en comparación con el huésped original). Los métodos de optimización de codones son bien conocidos por los expertos en la materia.

A los fines de la presente invención, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan con el mismo significado y son sinónimos. Por ejemplo, la frase "ácido nucleico codificante" es idéntica a la frase "polinucleótido codificante".

Un ADN, un polipéptido o una proteína "que comprende" o "que contiene" una secuencia particular 'X', como se utiliza a lo largo del texto, se relaciona con el ADN o la proteína que comprende o contiene al menos la secuencia 'X'. Por lo tanto, pueden incluirse otras secuencias de nucleótidos o aminoácidos en el extremo 5' (o N-terminal) y/o 3' (o C-terminal), por ejemplo, un marcador seleccionable y/o una secuencia líder 5' o una secuencia trasera 3'.

De manera similar, el uso del término "comprende" o "que comprende" y conjugaciones similares a lo largo de esta especificación o en las reivindicaciones adjuntas pretende incluir el número o el paso especificado, o bien el grupo de números o pasos, pero no excluye ningún otro número o paso, o grupo de números o pasos.

El término "vector" tal como se utiliza en el presente documento se refiere

a una molécula de ácido nucleico que es capaz de reproducir otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye un vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, incluyendo un "vector de clonación", así como un vector integrado en el genoma de la célula huésped en la que se introduce. Algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se utilizan indistintamente y se refieren a las células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transfectadas", que incluyen la célula transfectada primaria y las células de la progenie de la misma, independientemente del número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica a la célula progenitora en términos de composición de ácido nucleico, y puede comprender mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica por la que se examina o selecciona la célula transfectada original está comprendida en la presente invención.

El "porcentaje de (%) identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y excluyendo cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. En el contexto de este documento, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos significa el porcentaje de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenido mediante el alineamiento óptimo de dichas secuencias, en donde dicho porcentaje es

puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen aleatoriamente a través de las secuencias de aminoácidos. En el contexto de este documento, "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo" significa que un porcentaje de identidad especificado (ver a continuación) es el más alto para dicho alineamiento. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se realizan típicamente comparando las secuencias previamente alineadas óptimamente; esta comparación se realiza sobre sitios de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Además del método manual, la alineación más óptima para las secuencias que se van a comparar se puede lograr en virtud del algoritmo de búsqueda de homología local y homología general, utilizando software que implementa dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, T FAST A), y utilizando algoritmos de alineación de secuencias múltiples MUSCLE (EDGAR RC, MUSCLE: multiple sequencealign with high accurate y high throughput, Nucleic acids research, 2004, V. 32, N.5, p.1792-1797). Para la mejor alineación, puede ser preferible utilizar el software BLAST con la matriz BLOSUM 62. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando las dos secuencias dadas óptimamente alineadas, en donde las secuencias de aminoácidos pueden comprender adiciones y supresiones relativas a la secuencia de referencia para lograr la alineación óptima entre las dos secuencias dadas. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias dadas, dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias dadas.

El término "ligador peptídico" tal como se utiliza en el presente documento significa un péptido con diferentes secuencias de aminoácidos que, en una de las realizaciones, es de origen sintético. En una de las realizaciones, el ligador peptídico es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 30 aminoácidos de longitud, en una de las realizaciones, que tiene

una secuencia de aminoácidos de al menos 32-50 aminoácidos de longitud. En una de las realizaciones, el ligador peptídico es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de 32-40 aminoácidos de longitud. En una de las realizaciones, el ligador peptídico es $(G_xS)_n$, donde G significa glicina, S significa serina (x es 3, n es 8, 9 o 10; o x es 4 y n es 6, 7 u 8), en una de las realizaciones, x es 4, n es 6 o 7, en una de las realizaciones, x es 4, n es 7. En una de las realizaciones, el ligador peptídico es $(G_4S)_6G_2$.

El término "molécula fisiológicamente activa" significa una molécula que tiene cualquier tipo de actividad fisiológica *in vivo*, que funciona para regular la expresión genética y la función fisiológica, y para corregir condiciones anormales causadas por la deficiencia o el exceso de secreción de una sustancia que participa en la regulación de funciones *in vivo*.

El término "polipéptido fisiológicamente activo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere colectivamente a polipéptidos que tienen cualquier tipo de actividad fisiológica *in vivo*, que por lo general tienen una estructura polipeptídica y que tienen diferentes actividades fisiológicas. Los polipéptidos fisiológicamente activos incluyen polipéptidos que funcionan para regular la expresión genética y la función fisiológica, y para corregir condiciones anormales causadas por la deficiencia o el exceso de secreción de una sustancia que participa en la regulación de funciones *in vivo*. Los polipéptidos fisiológicamente activos pueden incluir agentes terapéuticos proteicos convencionales.

El polipéptido fisiológicamente activo puede seleccionarse del grupo que consiste, entre otros, en los siguientes: péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina (EPO), glucagón, oxintomodulina, insulina, hormona liberadora de hormona de crecimiento, péptido liberador de hormona de crecimiento, interferones, receptores de interferón, receptor

acoplado a proteína G, interleucinas, receptores de interleucina, enzimas, proteínas de unión a interleucina, proteínas de unión a citocina, factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento metastásico, alfa-1 antitripsina, albúmina, α -lactoalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina altamente glucosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombosmodulina, factores sanguíneos VII, VIIa, VIII, IX y XIII, y XIII, factor activador del plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de la renina, inhibidor de la collagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimulante del crecimiento óseo, calcitonina, atriopeptina, factor inductor del crecimiento del cartílago, elcatonina, factor activador del tejido conectivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, luterina, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona de la corteza suprarrenal, colecistoquinina, pancreático polipéptido, péptido liberador de gastrina, hormona liberadora de corticotropina, tirotrona, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos vacunales de origen viral, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos. Preferentemente, el polipéptido fisiológicamente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en lo siguiente: péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina (EPO), glucagón, oxintomodulina, insulina, análogos de insulina y derivados de los mismos.

El término "insulina" a los efectos de la presente invención significa la

hormona insulina humana. La insulina humana consta de dos cadenas polipeptídicas: la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos, y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, y las dos cadenas están unidas entre sí por puentes disulfuro: el primer puente se forma entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y el segundo puente se forma entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B. El tercer puente se forma entre las cisteínas en las posiciones 6 y 11 de la cadena A.

El término "análogo de insulina" para los fines de la presente invención significa una insulina modificada con uno o más residuos de aminoácidos de insulina reemplazados por otros residuos de aminoácidos, y/o uno o más residuos de aminoácidos eliminados de la insulina, y/o uno o más residuos de aminoácidos añadidos y/o insertados en la insulina. Los análogos de insulina preferidos de la invención incluyen, sin limitaciones, por ejemplo, aspart (es decir, insulina humana AspB28) e insulina lispro (es decir, insulina humana LysB28, ProB29), e insulina glulisina (insulina humana LysB3, GluB29), entre otros.

Además, el término "polipéptido fisiológicamente activo" como se utiliza en este documento pretende incluir no sólo los polipéptidos fisiológicamente activos que se producen naturalmente, sino también los agonistas, precursores, derivados, fragmentos o variantes de cada uno de los polipéptidos.

El término "ligador no peptídico" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un polímero biocompatible compuesto por dos o más unidades repetitivas unidas entre sí, en el que las unidades repetitivas están unidas entre sí mediante cualquier enlace covalente no peptídico. Este ligador no peptídico puede tener dos extremos o tres extremos.

Para los efectos de la presente invención, el término "fármaco" se refiere a una sustancia o mezcla de sustancias de origen sintético o natural, presentada en una forma farmacéutica, incluyendo, pero no limitándose a, la forma de comprimido, cápsula, solución, pomada, aerosol, etc., utilizada para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación en una forma que facilita la ejecución efectiva de la actividad biológica del ingrediente activo contenido en ella, y no comprende ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se va a administrar la composición.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una composición farmacéutica que es diferente del ingrediente activo y no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" (o una "terapia") se refiere a la intervención clínica en un intento de cambiar el curso natural de una enfermedad en un individuo que está siendo tratado, y puede llevarse a cabo ya sea con fines de prevención o durante el curso del tratamiento de una afección clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la minimización de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora de los síntomas o la paliación del estado patológico y la remisión o la mejora del pronóstico.

El término "instrucciones de uso" se utiliza para referirse a las instrucciones que normalmente se incluyen en las confecciones comerciales

de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

REALIZACIONES DE LA INVENCION

La presente invención proporciona polipéptidos de fragmentos Fc que tienen propiedades modificadas en relación con la unión con receptores Fc humanos en comparación con el correspondiente fragmento Fc de tipo salvaje. Dichos polipéptidos de fragmentos Fc comprenden mutaciones de aminoácidos específicos en sus dominios CH2 y/o CH3. Se descubrió que estas mutaciones permiten producir variantes de polipéptidos de fragmentos Fc con vidas medias *in vivo* adaptadas.

En una realización de la presente invención, un polipéptido de fragmento Fc es el fragmento Fc de la clase IgG humana.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc es el fragmento Fc de la clase IgG1 humana.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc es el fragmento Fc de la clase IgG2 humana.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc es el fragmento Fc de la clase IgG3 humana.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc es el fragmento Fc de la clase IgG4 humana.

En una realización de la presente invención, un par de dos polipéptidos

de fragmentos Fc pueden formar un dímero funcional.

En una realización de la presente invención, un receptor Fc humano se selecciona entre el receptor Fc neonatal humano y el receptor Fc γ humano.

En una realización de la presente invención, el receptor Fc γ humano se selecciona entre el receptor Fc γ RI humano, el receptor Fc γ RII humano y el receptor Fc γ RIII humano .

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc difiere de un polipéptido de fragmento Fc de tipo salvaje en 1 residuo de aminoácido, o 2, o 3, o 4, o 5, o 6, o 7, o 8, o 9, o 10, o 11, o 12 residuos de aminoácidos en la(s) posición(es) correspondiente(s) según el sistema de numeración del índice EU de Kabat.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende una o más mutaciones en posiciones correspondientes a las posiciones 222, 223, 224, 225, 226-238, 226, 234, 235, 236, 237, 239, 250, 252, 252, 254, 256, 262, 264, 264, 264, 268, 272, 274, 283, 285, 286, 288, 294, 296, 297, 300, 302, 303, 308, 308, 309, 309, 312, 315, 327, 328, 330, 330, 331, 339, 355, 356, 358, 378, 397, 409, 419, 427, 428, 434, 434, 445, y 444-446, según el sistema de numeración del índice Kabat EU.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende una o más de las siguientes mutaciones o combinaciones de mutaciones:

K222D, C223K, C224T, V225H, E226-P238del, E226W, P234E, 234insF235, V235L, A236G, G237M, S239E, T250Q, M252Y, M252W, S254T, T256E, V262W, V264del, V264D, V264E, H268Q, E272Q, Q274K, E283Q, H285E, N286E, K288M, E294Q, F296Y, N297D, F300Y, V302W, V303del, V308W, V308F, V309del, V309L, D312N, N315D, G327A, L328G, A330S,

A330F, P331S, T339A, R355Q, D356E, L358M, S378A, M397V, K409R, Q419E, V427L, M428L, N434Y, N434W, P445L y S444-G446del, según el sistema de numeración de índice Kabat EU .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones V262W, V264del, V302W, V303del, V308W, V309del y S378A, según el sistema de numeración de índice Kabat EU .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones M252Y, S254T, T256E y S378A, según el sistema de numeración del índice EU de Kabat.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones T250Q, M428L y S378A, según el sistema de numeración del índice EU de Kabat .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones M252Y, T256E, V264D, N297D, V308F, S378A y N434Y, según el sistema de numeración de índice Kabat EU .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones P234E, 234insF235, V235L, A236G, T256E, V264D, H268Q, H285E, N286E, N297D, F300Y, V309L, A330S, P331S, R355Q, S378A, M397V, K409R, Q419E, M428L y P445L, según el sistema de numeración del índice EU de Kabat .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones M252W, T256E, S378A, M428L y N434Y, según el sistema de numeración del índice EU de Kabat .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones S239E, T256E, V264E, A330F, S378A y N434Y, según el sistema de numeración del índice EU de Kabat .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones ins221D, V222K, ins223T, E224H, ins225W, G237M, T250Q, M252Y y V264D . según el sistema de numeración del índice Kabat EU .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones M252Y, T256E, V264E, N297D, V308F, A330F, S378A y N434W, según el sistema de numeración del índice EU de Kabat .

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la combinación de mutaciones correspondientes a las mutaciones T250Q, M252Y, T256E, V264E, V308F, A330F, S378A y N434W, según el sistema de numeración del índice EU de Kabat .

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos del fragmento Fc de IgG2 humano.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84,

85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEVTCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVVSVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQVYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX₁₇₇LDSDGSFFLYSX₁₈₉LTVDKSRWQX₁₉₉GNVFSCSVX₂₀₈HEALHX₂₁₄HYTQKSLSLSX₂₂₅G establecida en SEQ ID NO: 2, en donde

X₁ es E o D,

X₂ es K o está ausente,

X₃ es T o está ausente,

X₄ es H o está ausente,

X₅ es W o está ausente,

X₁₃ es P o E,

X₁₄ es F o ausente,

X₁₅ es V o L,

X₁₆ es A o G,

X₁₇ es G o M,

X₁₉ es S o E,

X₃₀ es T o Q,

X₃₂ es M, Y o W,

X₃₄ es S o T,

X₃₆ es T o E,

X₄₄ es V, E, o D,

X₄₈ es H o Q,

X₆₅ es H o E,

X₆₆ es N o E,

X₇₇ es N o D,

X_{80} es F o Y,
 X_{88} es V o F,
 X_{89} es V o L,
 X_{110} es A, F o S,
 X_{111} es P o S,
 X_{119} es T o A,
 X_{135} es R o Q,
 X_{177} es M o V,
 X_{189} es K o R,
 X_{199} es Q o E,
 X_{208} es M o L,
 X_{214} es N, Y o W, y
 X_{225} es P o L.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5$ CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEVTCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVVSVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQVYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX₁₇₇LDSDGSFFLYSX₁₈₉LTVDKSRWQX₁₉₉GNVFSCSVX₂₀₈HEALHX₂₁₄HYTQKSLSLSX₂₂₅G establecida en la SEQ ID NO:2, donde X_1 es E, X_2 está ausente, X_3 está ausente, X_4 está ausente, X_5 está ausente, X_{13} es P, X_{14} está ausente, X_{15} es V, X_{16} es A, X_{17} es G, X_{19} es S, X_{30} es T, X_{32} es Y, X_{34} es T, X_{36} es E, X_{44} es V, X_{48} es H, X_{65} es H, X_{66} es N, X_{77} es N, X_{80} es F, X_{88} es V, X_{89} es V, X_{110} es A, X_{111} es P, X_{119} es T, X_{135} es R, X_{177} es M, X_{189} es K, X_{199} es Q, X_{208} es M, X_{214} es N, y X_{225} es P.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5$ CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEV

TCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVV
SVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQ
VYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX
₁₇₇LDSDGSFFLYSX₁₈₉LTVDKSRWQX₁₉₉GNVFSCSVX₂₀₈HEALHX₂₁₄HYTQKS
LSLSX₂₂₅G establecida en la SEQ ID NO:2, donde X₁ es E, X₂ está ausente,
X₃ está ausente, X₄ está ausente, X₅ está ausente, X₁₃ es P, X₁₄ está ausente,
X₁₅ es V, X₁₆ es A, X₁₇ es G, X₁₉ es S, X₃₀ es Q, X₃₂ es M, X₃₄ es S, X₃₆ es T,
X₄₄ es V, X₄₈ es H, X₆₅ es H, X₆₆ es N, X₇₇ es N, X₈₀ es F, X₈₈ es V, X₈₉ es V,
X₁₁₀ es A, X₁₁₁ es P, X₁₁₉ es T, X₁₃₅ es R, X₁₇₇ es M, X₁₈₉ es K, X₁₉₉ es Q, X₂₀₈
es L, X₂₁₄ es N, y X₂₂₅ es P.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de
fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos
X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEV
TCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVV
SVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQ
VYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX
₁₇₇LDSDGSFFLYSX₁₈₉LTVDKSRWQX₁₉₉GNVFSCSVX₂₀₈HEALHX₂₁₄HYTQKS
LSLSX₂₂₅G establecida en SEQ ID NO:2, donde X₁ es E, X₂ está ausente, X₃
está ausente, X₄ está ausente, X₅ está ausente, X₁₃ es P, X₁₄ está ausente, X₁₅
es V, X₁₆ es A, X₁₇ es G, X₁₉ es S, X₃₀ es T, X₃₂ es Y, X₃₄ es S, X₃₆ es E, X₄₄ es
D, X₄₈ es H, X₆₅ es H, X₆₆ es N, X₇₇ es D, X₈₀ es F, X₈₈ es F, X₈₉ es V, X₁₁₀ es
A, X₁₁₁ es P, X₁₁₉ es T, X₁₃₅ es R, X₁₇₇ es M, X₁₈₉ es K, X₁₉₉ es Q, X₂₀₈ es M,
X₂₁₄ es Y, y X₂₂₅ es P.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de
fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos
X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEV
TCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVV
SVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQ
VYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX

¹⁷⁷LDSDGSFFLYSX¹⁸⁹LTVDKSRWQX¹⁹⁹GNVFSCSVX²⁰⁸HEALHX²¹⁴HYTQKS
LSLSX²²⁵G establecida en SEQ ID NO:2, donde X₁ es E, X₂ está ausente, X₃
está ausente, X₄ está ausente, X₅ está ausente, X₁₃ es E, X₁₄ es F, X₁₅ es L,
X₁₆ es G, X₁₇ es G, X₁₉ es S, X₃₀ es T, X₃₂ es M, X₃₄ es S, X₃₆ es E, X₄₄ es D,
X₄₈ es Q, X₆₅ es E, X₆₆ es E, X₇₇ es D, X₈₀ es Y, X₈₈ es V, X₈₉ es L, X₁₁₀ es S,
X₁₁₁ es S, X₁₁₉ es A, X₁₃₅ es Q, X₁₇₇ es V, X₁₈₉ es R, X₁₉₉ es E, X₂₀₈ es L, X₂₁₄
es N, y X₂₂₅ es L.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de
fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos
X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEV
TCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVV
SVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQ
VYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX
¹⁷⁷LDSDGSFFLYSX¹⁸⁹LTVDKSRWQX¹⁹⁹GNVFSCSVX²⁰⁸HEALHX²¹⁴HYTQKS
LSLSX²²⁵G establecida en SEQ ID NO:2, donde X₁ es E, X₂ está ausente, X₃
está ausente, X₄ está ausente, X₅ está ausente, X₁₃ es P, X₁₄ está ausente, X₁₅
es V, X₁₆ es A, X₁₇ es G, X₁₉ es S, X₃₀ es T, X₃₂ es W, X₃₄ es S, X₃₆ es E, X₄₄
es V, X₄₈ es H, X₆₅ es H, X₆₆ es N, X₇₇ es N, X₈₀ es F, X₈₈ es V, X₈₉ es V, X₁₁₀
es A, X₁₁₁ es P, X₁₁₉ es T, X₁₃₅ es R, X₁₇₇ es M, X₁₈₉ es K, X₁₉₉ es Q, X₂₀₈ es L,
X₂₁₄ es Y, y X₂₂₅ es P.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de
fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos
X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEV
TCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVV
SVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQ
VYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX
¹⁷⁷LDSDGSFFLYSX¹⁸⁹LTVDKSRWQX¹⁹⁹GNVFSCSVX²⁰⁸HEALHX²¹⁴HYTQKS
LSLSX²²⁵G establecida en SEQ ID NO:2, donde X₁ es E, X₂ está ausente, X₃
está ausente, X₄ está ausente, X₅ está ausente, X₁₃ es P, X₁₄ está ausente, X₁₅

es V, X₁₆ es A, X₁₇ es G, X₁₉ es E, X₃₀ es T, X₃₂ es M, X₃₄ es S, X₃₆ es E, X₄₄ es E, X₄₈ es H, X₆₅ es H, X₆₆ es N, X₇₇ es N, X₈₀ es F, X₈₈ es V, X₈₉ es V, X₁₁₀ es F, X₁₁₁ es P, X₁₁₉ es T, X₁₃₅ es R, X₁₇₇ es M, X₁₈₉ es K, X₁₉₉ es Q, X₂₀₈ es M, X₂₁₄ es Y, y X₂₂₅ es P.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEVTCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVVSVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQVYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX₁₇₇LDSDGSFFLYSX₁₈₉LTVDKSRWQX₁₉₉GNVFSCSVX₂₀₈HEALHX₂₁₄HYTQKSLSLSX₂₂₅G establecida en SEQ ID NO:2, donde X₁ es D, X₂ es K, X₃ es T, X₄ es H, X₅ es W, X₁₃ es P, X₁₄ está ausente, X₁₅ es V, X₁₆ es A, X₁₇ es M, X₁₉ es S, X₃₀ es Q, X₃₂ es Y, X₃₄ es S, X₃₆ es T, X₄₄ es D, X₄₈ es H, X₆₅ es H, X₆₆ es N, X₇₇ es N, X₈₀ es F, X₈₈ es V, X₈₉ es V, X₁₁₀ es A, X₁₁₁ es P, X₁₁₉ es T, X₁₃₅ es R, X₁₇₇ es M, X₁₈₉ es K, X₁₉₉ es Q, X₂₀₈ es M, X₂₁₄ es N, y X₂₂₅ es P.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEVTCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVVSVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQVYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX₁₇₇LDSDGSFFLYSX₁₈₉LTVDKSRWQX₁₉₉GNVFSCSVX₂₀₈HEALHX₂₁₄HYTQKSLSLSX₂₂₅G establecida en la SEQ ID NO:2, donde X₁ es E, X₂ está ausente, X₃ está ausente, X₄ está ausente, X₅ está ausente, X₁₃ es P, X₁₄ está ausente, X₁₅ es V, X₁₆ es A, X₁₇ es G, X₁₉ es S, X₃₀ es T, X₃₂ es Y, X₃₄ es S, X₃₆ es E, X₄₄ es E, X₄₈ es H, X₆₅ es H, X₆₆ es N, X₇₇ es D, X₈₀ es F, X₈₈ es F, X₈₉ es V, X₁₁₀ es F, X₁₁₁ es P, X₁₁₉ es T, X₁₃₅ es R, X₁₇₇ es M, X₁₈₉ es K, X₁₉₉ es Q, X₂₀₈ es M, X₂₁₄ es W, y X₂₂₅ es P.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃X₄X₅CPPCPAPX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇PX₁₉VFLFPPKPKDX₃₀LX₃₂IX₃₄RX₃₆PEVTCVVX₄₄DVSX₄₈EDPEVQFNWYVDGVEVX₆₅X₆₆AKTKPREEQFX₇₇STX₈₀RVVSVLTX₈₈X₈₉HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPX₁₁₀X₁₁₁IEKTISKX₁₁₉KGQPREPQVYTLPPSX₁₃₅EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPX₁₇₇LDSDGSFFLYSX₁₈₉LTVDKSRWQX₁₉₉GNVFSCSVX₂₀₈HEALHX₂₁₄HYTQKSLSLSX₂₂₅G establecida en SEQ ID NO:2, donde X₁ es E, X₂ está ausente, X₃ está ausente, X₄ está ausente, X₅ está ausente, X₁₃ es P, X₁₄ está ausente, X₁₅ es V, X₁₆ es A, X₁₇ es G, X₁₉ es S, X₃₀ es Q, X₃₂ es Y, X₃₄ es S, X₃₆ es E, X₄₄ es E, X₄₈ es H, X₆₅ es H, X₆₆ es N, X₇₇ es N, X₈₀ es F, X₈₈ es F, X₈₉ es V, X₁₁₀ es F, X₁₁₁ es P, X₁₁₉ es T, X₁₃₅ es R, X₁₇₇ es M, X₁₈₉ es K, X₁₉₉ es Q, X₂₀₈ es M, X₂₁₄ es W, y X₂₂₅ es P.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84,

85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10.

En una realización de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

La unión a los receptores Fc se puede determinar, por ejemplo, mediante ELISA o resonancia de plasmón de superficie (*surface plasmon resonance*, SPR) utilizando equipo estándar como el dispositivo BIAcore (GE Healthcare), y utilizando receptores Fc que se pueden producir mediante expresión recombinante. Alternativamente, la afinidad de unión de los dominios Fc o de los anticuerpos que contienen dominios Fc a los receptores Fc se puede evaluar utilizando líneas celulares que se sabe que expresan receptores Fc

específicos, como, entre otras, las células NK humanas que expresan el receptor FcγIIIa.

La unión a los receptores Fc también se puede determinar, por ejemplo, mediante la tecnología de interferometría de biocapa sin etiqueta (BLI) utilizando el sistema ForteBio Octet (véase, por ejemplo, TOBIAS R., MA W., "Analysis of FcRn-Antibody Interactions on the Octet Platform" (*Análisis de interacciones FcRn-Anticuerpo en la plataforma Octet*), ForteBio Appl Note 17, 2019, p.1-13; BAJARDI-TACCIOLI A. et al., Biolayer Interferometry-based FcγRIIa binding assay for a therapeutic antibody with strong effector function (*Ensayo de unión de FcγRIIa basado en interferometría de biocapa para un anticuerpo terapéutico con fuerte función efectora*), Bioquímica analítica, 2020, V. 611, p.113842).

La función efectora de un dominio Fc o de un anticuerpo que comprende un dominio Fc se puede evaluar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, evaluando la actividad ADCC de la molécula de interés (CLYNES R. et al., "Fc receptors are required in passenger y active immunity to melanoma" (*Los receptores Fc son necesarios en la inmunidad pasiva y activa al melanoma*), Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, V. 95, N. 2, p. 652-656). Como alternativa, se pueden utilizar métodos basados en análisis no radiactivos. Las células efectoras adecuadas para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK).

El experto también conocerá métodos para analizar la unión de FcRn y determinar la depuración o vida media in vivo (PETKOVA SB et al., Enhanced half-life of generically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease (*Vida media mejorada de anticuerpos IgG1 humanos diseñados genéricamente en un modelo de ratón FcRn humanizado: posible aplicación*

en enfermedades autoinmunes mediadas humoralmente), International immunology, 2006, V. 18, N. 12, p.1759-1769).

Según un aspecto, se proporciona aquí un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica un polipéptido de fragmento Fc de IgG humano como se describe aquí.

En algunas de las realizaciones, el ácido nucleico aislado (polinucleótido) codifica el polipéptido de la región Fc de longitud completa de la invención como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, el ácido nucleico aislado (polinucleótido) codifica un polipéptido comprendido en el polipéptido de la región Fc de la invención como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras realizaciones, el polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Las variantes de polipéptidos del fragmento Fc de la invención se pueden producir mediante síntesis de péptidos en fase sólida (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o mediante recombinación. Para la producción recombinante, uno o más polinucleótidos que codifican el polipéptido de fragmento Fc, por ejemplo, el polipéptido descrito anteriormente, se aíslan y se insertan en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho polinucleótido se puede aislar y secuenciar fácilmente utilizando procedimientos convencionales. Uno de los objetos de la invención es un vector, preferiblemente un vector de expresión, que comprende uno o más polinucleótidos según la invención.

Se pueden utilizar métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que comprenden la secuencia codificante del polipéptido de fragmento Fc junto con señales de control transcripcional/traduccionales adecuadas. Estos métodos incluyen tecnologías de ADN recombinante *in vitro*, síntesis *in vivo* y métodos de recombinación genética (véase, por ejemplo, THOMASON LC et al., Recombineering: genet engineering in bacteria using homologous recombination, (*Recombinación: ingeniería genética en bacterias mediante recombinación homóloga*) Current protocols in molecular biology, 2014, V. 106, N. 1, U.1.16). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, un virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico.

El vector de expresión comprende un casete de expresión en el que se clona un polinucleótido que codifica un polipéptido de fragmento Fc (es decir, la región codificante) de manera de proporcionar su enlace funcional con un promotor y/u otros elementos de control transcripcional o traduccional.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones que se traducen en aminoácidos. Aunque un "codón finalizador" (*stop codon*) (TAG, TGA o TAA) no se traduce en ningún aminoácido, puede, si está presente, considerarse parte de la región codificante; sin embargo, cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de transcripción, intrones, regiones no traducidas 5' y 3', etc., no son partes de la región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes en una construcción de polinucleótido individual, como un vector individual, o en construcciones de polinucleótidos separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede comprender una o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos que se separan postraduccionalmente o co-traslacionalmente en proteínas finales mediante escisión proteolítica.

En una realización de la presente invención, un vector, un polinucleótido o un ácido nucleico de la presente invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionadas o no fusionadas con un polinucleótido que codifica un polipéptido de fragmento Fc de la presente invención, o variantes o derivados del mismo. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, pero no se limitan a ello, elementos o motivos especializados tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo. Un enlace funcional está presente cuando la región codificante de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de tal manera que la expresión del producto génico está bajo la influencia o el control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado) están “funcionalmente unidos” o “operativamente unidos” si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado, y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias de control de expresión para dirigir la expresión del producto génico, y no interfiere con la capacidad de la plantilla de ADN para ser transcrita. Por lo tanto, una región promotora debe estar funcionalmente unida a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor es capaz de transcribir el ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que soporta niveles significativos de transcripción del ADN solo en células preseleccionadas. Otros elementos de control de la transcripción fuera de los promotores, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar operativamente unidos a un polinucleótido para mediar la transcripción específica de célula. En el presente documento se describen promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Los expertos en la materia conocen una amplia variedad de regiones de control transcripcional. Estas incluyen, entre otras, regiones de control transcripcional que funcionan en células de vertebrados, tales como, sin limitación, segmentos de promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano

inmediato en combinación con el intrón A), virus de simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tal como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control transcripcional incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Otras regiones de control transcripcional adecuadas incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido y promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclina). De manera similar, los expertos en la materia conocen una amplia variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión de ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción y elementos derivados de sistemas virales (en particular, el sitio de entrada interna al ribosoma, o IRES, también conocido como secuencia CITE).

El cassette de expresión también puede incluir otras estructuras específicas como un origen de replicación y/o elementos integrados cromosómicamente, tal como las repeticiones terminales largas (*long terminal repeats*, LTR) de los retrovirus o las repeticiones terminales invertidas (*inverted terminal repeats*, ITR) del virus adenoasociado (*adeno-associated virus*, AAV).

En una realización de la presente invención, el casete de expresión también puede incluir ADN o ARN que codifican una secuencia de proteína corta que se puede utilizar para facilitar una purificación adicional (por ejemplo, una etiqueta de histidina), o está destinada a etiquetar la proteína de fusión, puede estar incluida dentro o en los extremos del polinucleótido que codifica el polipéptido de fragmento Fc.

En una realización de la presente invención, el vector puede comprender además, independientemente unos de otros, los siguientes elementos estructurales: un gen que confiere resistencia a la tetraciclina respecto de las

células bacterianas; un sitio de iniciación de la replicación (ori) ; el gen ROP que regula el número de copias del plásmido; un promotor de transcripción (por ejemplo, Tac-T7); un terminador de transcripción (por ejemplo, rrnB1 B2 T1 txn); un gen LacI que codifica un represor del promotor Tac.

También se proporciona en la invención una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención está dentro del alcance de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden tener cualquiera de las características descritas en el presente documento, individualmente o en combinación. En una realización de la presente invención, la célula huésped comprende un vector (por ejemplo, se transforma o se transfecta con el vector) que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de fragmento Fc de la invención. En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que se puede diseñar para producir el polipéptido de fragmento Fc de la invención, o fragmentos de este.

Las células huésped adecuadas para la replicación y el mantenimiento de la expresión de polipéptidos del fragmento Fc son bien conocidas en la técnica. Dichas células pueden transfectarse o transducirse según sea apropiado con un vector de expresión específico, y se pueden cultivar cantidades mayores de células que contienen el vector para sembrar fermentadores a gran escala para producir el polipéptido de fragmento Fc en cantidades suficientes para uso clínico. Las células huésped que son útiles incluyen microorganismos procariotas como E. coli, o diversas células eucariotas como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insectos o similares. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden producir en bacterias, particularmente cuando no hay necesidad de glicosilación. Después de la expresión, el polipéptido se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble, y luego se la puede purificar aún más.

En una realización de la presente invención, se pueden utilizar organismos eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, como huéspedes para los vectores de clonación o expresión que codifican el polipéptido, incluyendo aquellas cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación han sido "humanizadas", permitiendo así la producción de un polipéptido con un patrón de glicosilación parcialmente o totalmente humano. (véase GERNGROSS T.U., *Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi (Avances en la producción de proteínas terapéuticas humanas en levaduras y hongos filamentosos)*, Nature biotechnology, 2004, T. 22, N. 11, p.1409-1414; y LI H. et al., *Optimization of humanized IgGs in glycoengineered Pichia pastoris (Optimización de IgG humanizadas en glicoingeniería de Pichia pastoris)*, Nature biotechnology, 2006, V. 24, N. 2, p.210-215). Las células huésped útiles para expresar polipéptidos (glicosilados) también pueden obtenerse a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados).

Entre las células de invertebrados se incluyen las células de insectos; también se pueden utilizar células vegetales. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y las células de insectos correspondientes adecuadas como sus huéspedes, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda* . También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes.

En una realización de la presente invención, también se pueden utilizar células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, se pueden utilizar líneas celulares de mamíferos adaptadas para cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos adecuadas incluyen la línea celular de riñón de mono transformada con SV40 CV1 (COS-7); línea celular de riñón embrionario humano, por ejemplo, HEK293 (GRAHAM FL et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 (Características de una línea celular humana transformada*

mediante ADN del adenovirus humano tipo 5), Journal of general virology, 1977, V. 36, N. 1, p. 59-72); células de riñón de hámster bebé (BHK); células de Sertoli de ratón; células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); Células TRI (*ver, por ejemplo*, MATHER J.P. et al., Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium (*Cultivo de células testiculares en medio libre de suero suplementado con hormonas*), Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York, 1982, V. 383, pág.44-68); células MRC 5 y células FS4.

En una realización de la presente invención, las líneas de células huésped de mamíferos pueden estar representadas por células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas las células CHO dhfr⁻ (URLAUB G. et al., Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1980, V. 77, N. 7, p.4216-4220); y líneas de células de mieloma tales como Sp2/0, NS0, P3X63, Y0 (véase , por ejemplo, STEINITZ M. et al. (ed.), Human monoclonal antibodies: Methods and Protocols, Nueva York: Humana Press, 2014).

Uno de los objetos de la invención es un método para producir un polipéptido de fragmento Fc según la invención, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos que codifican el polipéptido de fragmento Fc según la invención, y opcionalmente aislar el polipéptido de fragmento Fc de la célula huésped (o del medio de cultivo de la célula huésped).

En una realización, la presente invención proporciona además un método para producir un polipéptido de fragmento Fc de la presente invención

mediante el uso de tecnología de ADN recombinante, que incluye los pasos de:

- 1) proporcionar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de fragmento Fc;
- 2) insertar la secuencia de nucleótidos de (1) en un vector de expresión adecuado para producir un vector de expresión recombinante;
- 3) introducir el vector de expresión recombinante de (2) en una célula huésped adecuada;
- 4) cultivar la célula huésped transfectada en condiciones adecuadas para la expresión;
- 5) recoger y purificar el producto expresado.

La secuencia codificante se puede introducir en la célula huésped mediante diversos métodos conocidos en la técnica, tales como, entre otros métodos, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, electroporación, microinyección, infección viral y el método de iones de metal alcalino.

El cultivo y la expresión en células huésped son ampliamente conocidos en la técnica (véase , por ejemplo, GRAHAM, 1977; LI, 2006). Las células y los desechos en suspensión se pueden eliminar mediante centrifugación y se recoge el sobrenadante.

En una realización de la presente invención, el producto puede ser expresado por células como cuerpos de inclusión y puede ser concentrado adicionalmente, por ejemplo, mediante filtración de flujo tangencial o diafiltración, y purificado mediante cromatografía.

Los métodos para purificar proteínas recombinantes, incluyendo aquellas que comprenden fragmentos Fc de anticuerpos, son conocidos por un experto en la materia (véase , por ejemplo, SHI Y. et al., Advantages of CE-SDS over

SDS-PAGE in mAb pureness analysis, Analytical Methods, 2012, V. 4, N. 6, p. 1637-1642).

El polipéptido de fragmento Fc obtenido como se ha descrito anteriormente se puede purificar hasta obtener propiedades sustancialmente uniformes, por ejemplo, se puede representar mediante una única banda o bandas específicas en la electroforesis SDS-PAGE (gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio). En primer lugar, se concentra el sobrenadante. El sobrenadante concentrado se puede purificar aún más mediante cromatografía en gel o cromatografía de intercambio iónico, como cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de intercambio catiónico. La matriz del gel puede ser una matriz que se utiliza habitualmente para la purificación de proteínas, como agarosa, dextrano, poliamida, etc.

Finalmente, el producto purificado se puede pulir aún más mediante métodos como cromatografía de adsorción de hidroxapatita, cromatografía de quelatos metálicos, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, etc. Todos los pasos de purificación anteriores se pueden utilizar en varias combinaciones para obtener finalmente proteínas de pureza esencialmente uniforme.

El polipéptido de fragmento Fc expresado se puede purificar utilizando una columna de cromatografía de afinidad que contiene un anticuerpo, un receptor o un ligando específico para el polipéptido de fragmento Fc. Dependiendo de la naturaleza de la columna de afinidad utilizada, el polipéptido de fragmento Fc unido a la columna de afinidad se puede eluir utilizando métodos convencionales como un tampón con alto contenido de sal, cambio de pH, etc.

En una realización de la presente invención, la purificación por cromatografía del polipéptido de fragmento Fc se puede optimizar utilizando un

dominio auxiliar, por ejemplo, una etiqueta His-tag fusionada con el extremo N o C del polipéptido (KOSOBOKOVA E.N. et al., Auxiliary domains in recombinant proteins (a review) (*Dominios auxiliares en proteínas recombinantes (revisión)*), Biochemistry, 2016, Vol.

En una realización de la presente invención, el dominio auxiliar puede ser un polipéptido SUMO (véase, por ejemplo, BUTT T.R. et al., SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins, Protein expression and purification (BUTT T.R. et al., *Tecnología de fusión SUMO para proteínas difíciles de expresar, Expresión y purificación de proteínas*), 2005, V. 43, N. 1, pag. 1-9).

La presente invención también se refiere a construcciones que comprenden el polipéptido de fragmento Fc descrito anteriormente unido a una molécula terapéuticamente activa, incluido un polipéptido.

En el polipéptido de fragmento Fc acoplado a una molécula terapéuticamente activa según la invención, el polipéptido de fragmento Fc puede fusionarse genéticamente a un polipéptido fisiológicamente activo, o puede conjugarse químicamente a un polipéptido fisiológicamente activo. Se puede diseñar una fusión genética del polipéptido de la región Fc con un polipéptido fisiológicamente activo de tal manera que se fusione la secuencia del polipéptido de la región Fc con el polipéptido directamente, o indirectamente a través de una secuencia de enlace. La composición y longitud del enlace se pueden determinar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, y se puede evaluar su eficacia. En el presente documento se describen péptidos de enlace específicos. Si se desea, también se pueden incluir secuencias adicionales, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa, en el sitio de escisión para separar los componentes de fusión individuales. Además, el polipéptido de fusión de la invención se puede sintetizar químicamente utilizando métodos de síntesis de polipéptidos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield).

El polipéptido de fragmento Fc de la presente invención puede fusionarse directamente a un polipéptido fisiológicamente activo, o a través de un péptido ligador que comprende uno o más aminoácidos, típicamente alrededor de 2-20 aminoácidos, para formar una construcción de fusión. Los péptidos ligadores son conocidos en la técnica y se describen en este documento. Los péptidos ligadores no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, donde "n" típicamente denota un número entero de 1 a 10, típicamente de 2 a 4. En una realización de la invención, el péptido ligador consta de al menos 5 aminoácidos, en una realización de la invención consta de 5-100 aminoácidos, en una realización adicional de la invención consta de 10-50 aminoácidos. En una realización específica de la invención, el péptido ligador consta de 15 aminoácidos. En una realización de la invención, el péptido de enlace es $(G_xS)_n$ o $(G_xS)_nG_m$, donde G denota glicina, S denota serina y $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ o } 6, y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, o $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ o } 5, y m = 0, 1, 2 \text{ o } 3)$, en una realización de la invención $x = 4$ y $n = 2 \text{ o } 3$, en otra realización de la invención $x = 4$ y $n = 3$. En una realización específica de la invención, el péptido de enlace es $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:12).

En una realización de la invención, el péptido ligador tiene (o consiste en) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12.

En una realización de la invención, el péptido ligador tiene (o consiste en) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13.

En una realización de la invención, el péptido ligador tiene (o consiste en) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:14.

En una de las realizaciones, un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido de fragmento Fc puede comprender además un péptido líder en el extremo N.

En una de las realizaciones, el péptido líder es el péptido SUMO de SEQ ID NO:26.

El polipéptido fisiológicamente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina (EPO), glucagón, oxintomodulina, insulina, hormona liberadora de hormona de crecimiento, péptido liberador de hormona de crecimiento, interferones, receptores de interferón, receptor acoplado a proteína G, interleucinas, receptores de interleucina, enzimas, proteínas de unión a interleucina, proteínas de unión a citocina, factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfotoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento metastásico, alfa-1 antitripsina, albúmina, α -lactoalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina altamente glucosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factores sanguíneos VII, VIIa, VIII, IX y XIII, factor activador del plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de la renina, inhibidor de la collagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimulante del crecimiento óseo, calcitonina, atriopeptina, factor inductor del crecimiento del cartílago, elcatonina, factor activador del tejido conectivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, luliberina, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona de la corteza suprarrenal, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, hormona liberadora de corticotropina, tirotropina, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos

de vacunas de origen viral, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos. Preferentemente, el polipéptido fisiológicamente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina (EPO), glucagón, oxintomodulina, insulina, análogos de insulina y derivados de los mismos, pero no se limita a los polipéptidos anteriores.

El término "insulina" a los efectos de la presente invención significa la hormona insulina humana. La insulina humana consta de dos cadenas polipeptídicas: la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos, y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, y las dos cadenas están unidas entre sí por puentes disulfuro: el primer puente se forma entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y el segundo puente se forma entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B. El tercer puente se forma entre las cisteínas en las posiciones 6 y 11 de la cadena A.

En los seres humanos, la hormona se sintetiza como un precursor de proinsulina de cadena única (preproinsulina), que consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos de longitud seguido de la proinsulina de 86 aminoácidos de longitud con la siguiente configuración: prepéptido-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A, donde C es un péptido ligador de 31 aminoácidos de longitud. Arg-Arg y Lys-Arg son los sitios de escisión para escindir el péptido ligador de las cadenas A y B.

El término "análogo de insulina" para los fines de la presente invención significa una insulina modificada con uno o más residuos de aminoácidos de insulina reemplazados por otros residuos de aminoácidos, y/o uno o más residuos de aminoácidos eliminados de la insulina, y/o uno o más residuos de aminoácidos añadidos y/o insertados en la insulina. Los análogos de insulina

preferidos de la invención incluyen, sin limitaciones, por ejemplo, aspart (es decir, insulina humana AspB28) e insulina lispro (es decir, insulina humana LysB28, ProB29), e insulina glulisina (insulina humana LysB3, GluB29), entre otros.

Además, el término "polipéptido fisiológicamente activo" como se utiliza en este documento pretende incluir no sólo polipéptidos fisiológicamente activos de origen natural, sino también agonistas, precursores, derivados, fragmentos o variantes de cada uno de los polipéptidos.

El polipéptido de fragmento Fc de la presente invención se puede conjugar químicamente con otras moléculas fisiológicamente activas, por ejemplo, polipéptidos fisiológicamente activos, utilizando técnicas de conjugación química bien conocidas. Para este fin, se pueden utilizar reactivos de reticulación bifuncionales, tales como reactivos de reticulación homofuncionales o heterofuncionales bien conocidos en la técnica. El tipo de reactivo de reticulación que se va a utilizar depende de la naturaleza de la molécula que se va a conjugar con el polipéptido de fragmento Fc, y puede ser fácilmente determinado por los expertos en la técnica. En una realización alternativa o adicional, el polipéptido de la región Fc y/o la molécula que se pretende conjugar con el mismo se pueden derivatizar químicamente de modo tal que ambos se puedan conjugar utilizando una reacción separada, que también es bien conocida en la técnica.

El polipéptido de fragmento Fc de la presente invención se puede conjugar químicamente con otras moléculas fisiológicamente activas, por ejemplo, polipéptidos fisiológicamente activos, mediante un ligador no peptídico.

El ligador no peptídico utilizado en la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol,

copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables como ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico, y derivados y/o combinaciones de los mismos, entre otros. Preferentemente, es un polietilenglicol.

Además, según la presente invención, el ligador no peptídico que está unido al polipéptido de fragmento Fc puede estar compuesto no sólo de un tipo de polímero, sino también de una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El ligador no peptídico utilizado en la presente invención tiene grupos reactivos capaces de unirse al polipéptido de fragmento Fc y a un fármaco proteico.

Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, carboximetilo de succinimidilo o carbonato de succinimidilo. En particular, si el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos, el polipéptido fisiológicamente activo y el polipéptido de fragmento Fc se unen de manera efectiva a ambos extremos del ligador no peptídico, respectivamente, mientras que se minimizan las reacciones no específicas. El producto final formado a través de alquilación reductora a través de un enlace aldehído es significativamente más estable que el enlazado a través de un enlace amida. El grupo reactivo aldehído puede unirse selectivamente al extremo N a un pH bajo y puede formar un enlace covalente con el residuo de lisina a pH alto, por ejemplo, pH 9,0.

Los grupos reactivos en ambos extremos del ligador no peptídico pueden

ser iguales o diferentes. Por ejemplo, un extremo del ligador no peptídico puede tener un grupo maleimida, y el otro extremo puede tener un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o butiraldehído. Cuando se utiliza un polietilenglicol que tiene grupos reactivos de hidroxilo en ambos extremos como ligador no peptídico, los grupos hidroxilo se pueden activar a varios grupos reactivos mediante una reacción química conocida. Alternativamente, se puede utilizar un polietilenglicol disponible comercialmente que tenga un grupo reactivo modificado para producir el conjugado de la presente invención.

La presente invención también se refiere a un método para producir una construcción de fusión basada en los polipéptidos del fragmento Fc descritos en este documento, en donde dicho método comprende cultivar una célula huésped descrita en este documento para producir un constructo de fusión basado en los polipéptidos del fragmento Fc fusionados a un polipéptido fisiológicamente activo como se describió anteriormente.

La presente invención también se refiere a un método para producir un conjugado basado en los polipéptidos del fragmento Fc descritos en este documento, en donde dicho método comprende conjugar el polipéptido de fragmento Fc con un polipéptido fisiológicamente activo como se describió anteriormente.

La presente invención también se refiere al uso del fragmento Fc de la invención para la producción de un fármaco.

La presente invención también se refiere al uso del fragmento Fc de la invención para modificar la vida media de un polipéptido fisiológicamente activo.

La presente invención también se refiere al uso de la construcción de fusión basado en el polipéptido de fragmento Fc fusionado al polipéptido

fisiológicamente activo como se describe en este documento para la producción de un fármaco que comprende dicha construcción como ingrediente activo.

La presente invención también se refiere al uso de un conjugado basado en el polipéptido de fragmento Fc conjugado con el polipéptido fisiológicamente activo como se describe en este documento para la producción de un fármaco que comprende dicho conjugado como ingrediente activo.

En un aspecto de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc tiene insulina o un agonista, precursor, derivado, fragmento o variante de la misma como socio de fusión o conjugación para una construcción de fusión o conjugado.

En un aspecto de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc está destinado a ser utilizado en un método para producir un fármaco, en donde el uso es como un socio de fusión o conjugación para la insulina o un agonista, precursor, derivado, fragmento o variante de la misma, y en donde el fármaco se puede utilizar en el tratamiento de afecciones que son sensibles a la insulina, por ejemplo, la diabetes de tipo I, diabetes de tipo II y la hiperglucemia, y similares.

En un aspecto de la presente invención, el polipéptido de fragmento Fc está destinado a ser utilizado en una preparación de fármaco, como un socio de fusión o conjugación para la insulina, o un agonista, precursor, derivado, fragmento o una variante de la misma, en donde el fármaco se puede utilizar para tratar afecciones que son sensibles a la insulina, por ejemplo, diabetes tipo I, diabetes tipo II e hiperglucemia, etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Estructura general del plásmido de expresión para proteínas

fusionadas con el polipéptido de fragmento Fc.

IMPLEMENTACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, pero sin limitarse a ellos.

Ejemplo 1. Generación de constructos

Para investigar el efecto de ciertas modificaciones en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fragmento Fc sobre su capacidad para unirse a FcRn y geFcγR, se generaron los siguientes constructos: GP20091.01-L1-01 (SEQ ID NO:16), GP20091.01-L2-05 (SEQ ID NO:17), GP20091.01-L2-06 (SEQ ID NO:18), GP20091.01-L2-07 (SEQ ID NO:19), GP20091.01-L2-08 (SEQ ID NO:20), GP20091.01-L2-09 (SEQ ID NO:21), GP20091.01-L2-10 (SEQ ID NO:22), GP20091.01-L2-12 (SEQ ID NO:23), GP20091.01-L2-13 (SEQ ID NO:24), GP20091.01-L2-14 (SEQ ID NO:25), donde las variantes polipeptídicas del fragmento Fc se fusionaron al extremo C de la insulina de cadena sencilla de SEQ ID NO:17 mediante el ligador polipeptídico de SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16.

Para obtener dichos constructos, se transfectaron células de la cepa *Escherichia coli* BL21 con los plásmidos adecuados, que proporcionaban la expresión de los constructos GP20091.01-L1-01, GP20091.01-L2-05, GP20091.01-L2-06, GP20091.01-L2-07, GP20091.01-L2-08, GP20091.01-L2-09, GP20091.01-L2-10, GP20091.01-L2-12, GP20091.01-L2-13 y GP20091.01-L2-14 fusionadas con el péptido líder SUMO, y la proteasa ULP que proporcionaba la hidrólisis selectiva del péptido líder SUMO. Las secuencias codificantes de las proteínas investigadas se establecen en SEQ ID NO.:27-35.

La estructura general de los plásmidos utilizados para producir las

proteínas objetivo se muestra en la Figura 1.

Cada plásmido comprende:

1. Un gen que confiere resistencia a la tetraciclina a las células bacterianas, un sitio de inicio de la replicación (ori) y el gen ROP que regula el número de copias del plásmido;
2. El promotor de transcripción tac/T7 que inicia la expresión de la proteína recombinante;
3. Las secuencias del gen que codifica la molécula Met-SUMO-GP20091.01-L2-XX y del gen que codifica la proteasa ULP, que están bajo el control del promotor Tac-T7 y forman un operón;
4. El terminador de la transcripción rrnB1 B2 T1 txn;
5. Gen LacI que codifica el represor del promotor Tac;
6. EcoRI y SpeI, los sitios de restricción donde se inserta el gen;
7. Cebadores de secuenciación Pr1082 y Pr166.

La transfección celular se realizó mediante electroporación.

La biomasa celular se aisló mediante centrifugación utilizando una centrífuga de pie Avanti J-HC y un rotor JLA-8.1000 según un protocolo estándar (20 min, 8000 rpm). Los pellets celulares se envasaron en bolsas de polietileno con cierre hermético etiquetadas y se almacenaron en un congelador a temperaturas que no excedieran los -18 °C.

Para la descomposición de la pared celular bacteriana, se realizó una desintegración secuencial doble de biomasa utilizando un homogeneizador de alta presión. Antes de la descomposición celular, se realizó un paso de resuspensión de la cantidad requerida de biomasa. Para ello, los pellets celulares se descongelaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en un tampón de desintegración enfriado a 4 °C (20 mM Tris; 5 mM EDTA pH 8,0) utilizando un homogeneizador de inmersión Polytron 3100D; la

homogeneización se realizó durante 10 minutos hasta que la solución fuera visualmente homogénea.

Los cuerpos de inclusión se aislaron mediante centrifugación utilizando una centrífuga independiente Avanti J-HC y un rotor JLA-8.1000 según el protocolo estándar (20 min, 8000 rpm).

Para solubilizar los constructos, se colocó una submuestra de cuerpos de inclusión en un recipiente de volumen adecuado, se agregó la cantidad requerida de solución tampón de solubilización (7 M de clorhidrato de guanidina, 100 mM de Tris, 15 mM de DTT, pH 9,5) y se agitó hasta que los agregados de proteína se disolvieron completamente.

Para producir las proteínas de fusión investigadas en forma dimérica, utilizamos un tampón (urea 2 M, Arg 300 mM, Tris 50 mM, pH 8,25), L-cisteína 0,55 mM como agente reductor y L-cistamina 0,55 mM como agente oxidante. El proceso de replegamiento se llevó a cabo durante 16 horas a 2-8 °C y una velocidad de agitación de 200 rpm.

Purificación de los constructos proteicos resultantes.

La purificación cromatografía de las estructuras producidas se lleva a cabo sucesivamente mediante cromatografía de afinidad con proteína A, cromatografía de interacción hidrofóbica (sobre el sorbente Butyl Sepharose™ 4 Fast Flow) y cromatografía de intercambio aniónico (utilizando el sorbente Q Sepharose 4FF).

Ejemplo 2. Unión de FcRn

La unión del polipéptido de fragmento Fc a FcRn se determinó utilizando el método de interferometría de biocapa sin etiqueta. La cinética de unión para

el receptor Fc neonatal biotinilado preparado (Immunitrack) se evaluó utilizando un interferómetro de microplaca Octet Red96 (ForteBio) y un kit de sensores (biosensores de estreptavidina (sa), Sartorius), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se utilizó rituximab de Mabxience como referencia. Las mediciones se llevaron a cabo a pH 6,0 . Las curvas de unión de referencia sustraída se analizaron con el software ForteBio Acquisition Manager de acuerdo con el procedimiento estándar utilizando un modelo de interacción 1:1. Los resultados se presentan en la Tabla 1, donde R^2 es el coeficiente de determinación.

Tabla 1. Resultados de la unión de FcRn

	KD (M)	KD (nM)	R^2
Rituximab	1.26E-09	1.3	0.734
GP20091.01-L1-01	1.26E-09	1.3	0.7336
GP20091.01-L2-05	5.46E-10	0.55	0.848
GP20091.01-L2-06	5.47E-10	0.55	0.816
GP20091.01-L2-08	1.72E-09	1.7	0.902
GP20091.01-L2-09	6.35E-10	0.63	0.909
GP20091.01-L2-10	4.32E-10	0.43	0.806
GP20091.01-L2-12	4.77E-10	0.48	0.929

Se halló que las variantes polipeptídicas del fragmento Fc resultantes tenían una unión similar o mejorada al FcRn humano en comparación con los fragmentos Fc de tipo salvaje. También se obtuvieron resultados similares a un pH de 7.4.

Ejemplo 3. Unión de Fc RI

La cinética de unión del FcyRI biotinilado (CD64/FCGR1A) se evaluó mediante el método de interferometría de biocapa sin etiqueta en el interferómetro de microplaca Octet Red96 de 96 pocillos (Pall ForteBio). Se

utilizó una solución de rituximab (MB01, Mabxience) como control positivo.

En el ensayo se utilizaron sensores de estreptavidina (Sartorius, cat. n.º 18–5019) hidratados durante 10 minutos en una solución de PBST al 0,05 %. Se utilizó el receptor FcγRI biotinilado a 2,5 µg/ml. Las muestras investigadas se diluyeron en una solución de PBST al 0,05 %, pH 7,4. Para el control positivo de rituximab y las muestras de prueba GP20091.01-L2, se analizaron concentraciones equimolares de 1,75 nmol/ml, 0,44 nmol/ml, 0,11 nmol/ml, 0,03 nmol/ml y 0,007 nmol/ml. Se utilizó el modelo de interacción 1:1 en el procesamiento de datos. Los resultados se presentan en la Tabla 2, donde R² es el coeficiente de determinación.

Tabla 2. Resultados de unión de FcγRI

	KD (M)	KD (nM)	R2
Rituximab	1.23E-09	1.23	0,996
GP20091.01-L2-05	3.17E-12	0.003	0,097
GP20091.01-L2-09	4.33E-09	4.33	0,975
GP20091.01-L2-10	8.92E-10	0.89	0,809
GP20091.01-L2-12	5.06E-07	506	No encontrado

Unión de FcγRII

La cinética de unión del FcγRII biotinilado (CD32a/FCGR2A) se evaluó mediante el método de interferometría de biocapa sin etiqueta en el interferómetro de microplaca Octet Red96 de 96 pocillos (Pall ForteBio). Se utilizó una solución de rituximab (MB01, Mabxience) como control positivo.

En el ensayo se utilizaron sensores de estreptavidina (Sartorius, cat. n.º 18–5019) hidratados durante 10 minutos en una solución de PBST al 0,05 %. Se utilizó el receptor FcγRII biotinilado a 2,5 µg/ml. Las muestras investigadas se diluyeron en una solución de PBST al 0,05 %, pH 7,4. Para el control positivo

de rituximab y las muestras de prueba GP20091.01-L2, se analizaron concentraciones equimolares de 1,75 nmol/ml, 0,44 nmol/ml, 0,11 nmol/ml, 0,03 nmol/ml y 0,007 nmol/ml. Las curvas de unión de referencia sustraída se analizaron con el software ForteBio Acquisition Manager de acuerdo con el procedimiento estándar utilizando un modelo de interacción 1:1. Los resultados se presentan en la Tabla 3, donde R² es el coeficiente de determinación.

Tabla 3. Resultados de unión de FcγRII

	KD (M)	KD (nM)	R2
Rituximab	4.05E-09	4.05	0,840
GP20091.01-L2-05	8.17E-07	816.500	No encontrado
GP20091.01-L2-09	8.21E-08	82.08	0,995
GP20091.01-L2-10	2.86E-06	2856.00	No encontrado
GP20091.01-L2-12	No encontrado	No encontrado	No encontrado

Unión de FcγRIII

La cinética de unión al FcγRIII biotinilado (CD16a/FCGR3A) se determinó mediante el método de interferometría de biocapa sin etiqueta en el interferómetro compatible con placa de 96 pocillos Octet Red96 (Pall ForteBio). Se utilizó una solución de rituximab como control positivo. (MB01, Mabxience).

En el ensayo se utilizaron sensores de estreptavidina (Sartorius, cat. n.º 18–5019) hidratados durante 10 minutos en una solución de PBST al 0,05 %. Se utilizó el receptor FcγRIII biotinilado a 2,5 µg/ml. Las muestras de prueba se diluyeron en una solución de PBST al 0,05 %, pH 7,4. Para el control positivo de rituximab, se evaluaron las siguientes concentraciones: 1.2 nmol/mL, 0.3 nmol/mL, 0.08 nmol/mL, 0.02 nmol/mL, and 0.005 nmol/mL. Las muestras de prueba GP20091.01-L2 se analizaron en concentraciones equimolares de 25

nmol/ml, 8,3 nmol/ml, 2,8 nmol/ml, 0,93 nmol/ml y 0,309 nmol/ml. Las curvas de unión de referencia sustraída se analizaron con el software ForteBio Acquisition Manager de acuerdo con el procedimiento estándar utilizando un modelo de interacción 1:1. Los resultados se presentan en la Tabla 4, donde R² es el coeficiente de determinación.

Tabla 4. Resultados de unión de FcγRIII

	KD (M)	KD (nM)	R ²
Rituximab	4.94E-07	493.5	0.938
GP20091.01-L2-05	1.00E-07	100	No encontrado
GP20091.01-L2-09	1.00E-07	100	No encontrado
GP20091.01-L2-10	9.18E-02	91,790,000	No encontrado
GP20091.01-L2-12	1.00E-07	100	No encontrado

Los resultados experimentales mostraron una unión significativamente más débil o nula de los polipéptidos del fragmento Fc variante producidos a varios receptores Fc humanos en comparación con el fragmento Fc de tipo salvaje.

Ejemplo 4.

Para confirmar la retención de la actividad biológica del socio de fusión, se evaluó la captación de glucosa inducida por las proteínas de fusión resultantes.

La absorción de glucosa se estudió utilizando la línea celular de mioblastos de rata L6J1 (Instituto de Citología, Academia Rusa de Ciencias). La suspensión celular de trabajo se sembró en placas de 96 pocillos a 8000 células/pocillo en DMEM + 2% de suero de caballo (HS). Las células dispersadas en DMEM + 10% FBS se utilizaron como control. Después de 72 horas, el medio se cambió a DMEM + 2% HS en los pocillos experimentales y DMEM + 10% en los pocillos de control. El séptimo día del experimento, las

células se dejaron sin nutrientes durante 24 horas añadiendo DMEM glu 4,5 g/L, sin rojo fenol, s/f, a todos los pocillos.

La muestra de prueba se añadió a los pocillos en concentraciones de 2 nM, 20 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 800 nM, 1600 nM, 3200 nM y 5000 nM. Se añadió Rinsulin R como control en concentraciones de 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 400 nM, 800 nM, 1600 nM y 2500 nM. Posteriormente, las células se incubaron con las muestras de prueba y los controles durante 72 horas.

La concentración de glucosa se midió utilizando el kit de glucosa GOD-PAP añadiendo medio de cultivo a la solución de glucosa de trabajo GOD-PAP. La detección se llevó a cabo en un lector de microplacas multimodal CLARIOstar. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Mediciones de la captación inducida de glucosa

	E _{max} , mmol/l	IC ₅₀ , nM	AW, %	RA, %
Rinsulina R	8.9	211.1	104%	n/d
GP20091.01-L2-05	14.4	436.6	33%	48%
GP20091.01-L2-06	14.9	1047	12%	20%
GP20091.01-L2-08	14.2	670.2	29%	32%
GP20091.01-L2-09	8.78	783.4	104%	25%
GP20091.01-L2-10	12.98	25.22	43%	367%
GP20091.01-L2-12	13.3	35.08	43%	264%

Todas las proteínas de fusión investigadas provocaron una disminución en los niveles de glucosa y exhibieron actividad biológica en los niveles correspondientes a la insulina humana recombinante.