(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 932 285**

(51) Int. CI.:

A61K 47/68 (2007.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 19213331 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2022 EP 3701971**

(54) Título: **Compuestos útiles en la preparación de inmunoglobulina híbrida que contiene una unión distinta de peptidilo**

(30) Prioridad:

14.03.2014 US 201461953650 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2023

(73) Titular/es:

BIOMOLECULAR HOLDINGS LLC (100.0%)
329 Primrose Road No.2
Burlingame CA 94010, US

(72) Inventor/es:

CAPON, DANIEL J.

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos útiles en la preparación de inmunoglobulina híbrida que contiene una unión distinta de peptidilo

Antecedentes de la invención

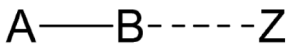
Las proteínas prefieren formar estructura fibrosas o globulares compactas, minimizando su exposición a disolvente. Esta tendencia es inherente tanto en la estructura principal de polipéptidos con su propensión por una estructura secundaria unida por enlaces de hidrógeno como en interacciones de cadenas laterales que fomentan el plegamiento terciario. Por tanto, esfuerzos anteriores por introducir "flexibilidad" en anticuerpos usando péptidos han sido en gran medida inadecuados. Por ejemplo, resulta habitual emplear combinaciones de un aminoácido que favorece interacciones con disolvente (por ejemplo, serina) con uno que descompone la estructura helicoidal (por ejemplo, glicina). Aunque este enfoque resulta útil en la preparación de proteínas de fusión tales como fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv), las estructuras resultantes son realmente bastante compactas sin evidencias de capacidad de extensión (por ejemplo, véase Robert *et al*, (2009) Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. Protein Eng. Des. Sel. 22, 199-208). Además, es probable que tales secuencias creen problemas adicionales debido a su inmunogenicidad intrínseca y sensibilidad proteolítica.

Thomas *et al.*, Bioconjugate Chemistry 2012, 23, 2007-2013 describen un enfoque en el que fragmentos Fc de anticuerpo que albergan un único residuo de selenocisteína C-terminal (Fc-Sec) se unen a un grupo de unión bifuncional que contiene un "asa" de ciclooctino

Existe una necesidad de nuevos compuestos de proteína, que incorporen cadenas distintas de proteína, que sean tanto flexibles como extensibles, así como de procedimientos para producir tales compuestos.

Sumario de la invención

En un primer aspecto no cubierto por la presente invención, la memoria descriptiva describe un compuesto que tiene la estructura:



en la que A es una estructura biológicamente activa del compuesto;

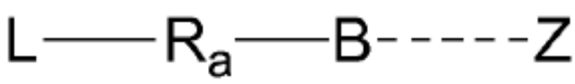
en la que Z es un componente de proteína del compuesto, componente de proteína que comprende uno o más polipéptidos, en el que al menos uno de los uno o más polipéptidos comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una cisteína o una selenocisteína;

en la que B es una estructura química que une A y Z;

en la que la línea discontinua entre B y Z representa una unión peptidilo; y

en la que la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo.

La presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:



en la que Z es un componente de proteína del compuesto, componente de proteína que comprende uno o más polipéptidos, en el que al menos uno de los uno o más polipéptidos comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una cisteína o una selenocisteína;

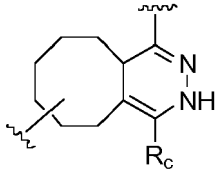
en la que B es un residuo de ácido orgánico, o un tramo de 1-50 residuos de aminoácido que une R_a y Z;

en la que la línea discontinua entre B y Z representa una unión peptidilo entre una cisteína o selenocisteína N-terminal de un polipéptido de Z y un residuo de aminoácido o un residuo de ácido orgánico de B;

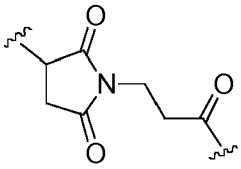
en la que L se selecciona del grupo que consiste en: una tetrazina y un trans-cicloocteno; y

en la que R_a es un enlace o una estructura orgánica que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico),

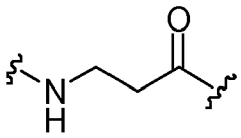
polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



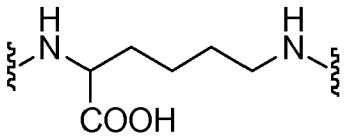
,



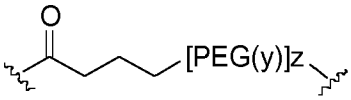
,



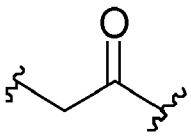
,



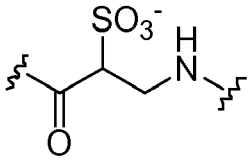
,



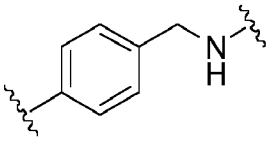
,



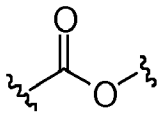
,



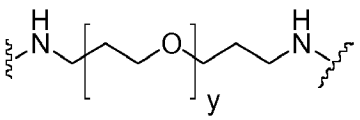
,



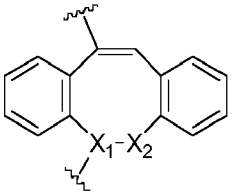
,



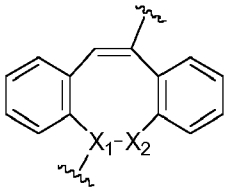
,



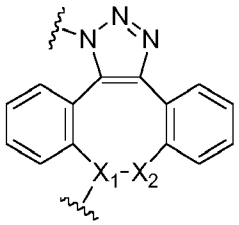
,



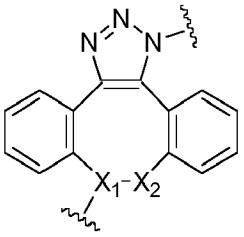
,



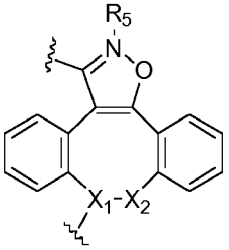
,

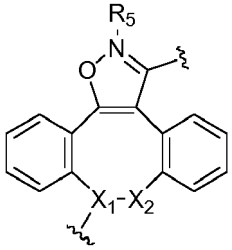


,



,



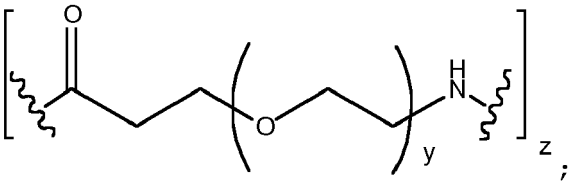


y

;

en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en los que [PEG(y)]z es:



;

en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En un aspecto adicional no cubierto por la presente invención, la memoria descriptiva también describe un procedimiento para producir un compuesto que tiene la estructura:

A——B- - - -Z

en la que A es una estructura biológicamente activa del compuesto;

en la que Z es un componente de proteína del compuesto, componente de proteína que comprende uno o más polipéptidos, en el que al menos uno de los uno o más polipéptidos comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una cisteína o una selenocisteína;

en la que B es una estructura química que une A y Z;

en la que la línea discontinua entre B y Z representa una unión peptidilo;

en la que la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo;

que comprende las siguientes etapas:

a) obtener un A' que comprende A o un derivado de A, y un primer grupo reactivo terminal;

b) obtener un B' que comprende B o un derivado de B, un segundo grupo reactivo terminal y un tercer grupo reactivo terminal, en el que el segundo grupo reactivo terminal puede reaccionar con el primer grupo reactivo terminal para formar una unión distinta de peptidilo;

c) obtener un Z' que comprende Z o un derivado de Z, y un cuarto grupo reactivo terminal, en el que el cuarto grupo reactivo terminal puede reaccionar con el tercer grupo reactivo terminal para formar una unión peptidilo; y

d) hacer reaccionar A', B' y Z' en cualquier orden para producir el compuesto.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la preparación de TNR1B modificado con alquino mediante escisión de una proteína de fusión de TNR1B-inteína con cistil-propargilamida. El subproducto de inteína se retira mediante cromatografía con quitina. TNR1B modificado con azida y TNR1B modificado con cicloalquino se preparan de manera similar usando cistil-3-azidopropilamida, y diversos derivados de ciclooctino (por ejemplo, DIBAC) de cisteína, respectivamente.

La figura 2 muestra la escisión de TNR1B mediante (1) cisteína, (2) cisteína + mercaptoetano-sulfonato (MESNA), (3) cistil-propargilamida, (4) cistil-propargilamida + MESNA y (5) MESNA. Todos los compuestos se usaron a una concentración de 50 mM.

La figura 3 muestra la preparación de Fc6 modificado con azida mediante ligación (peptidilo) del dímero de Fc6 y azida-DKTHT-tioéster (tabla 1).

La figura 4 muestra la preparación de Fc6 modificado con azida mediante ligación (peptidilo) del dímero de Fc6 y azida-PEG_n-DKTHT-tioéster (tabla 1). Fc modificado con cicloalquino se prepara de manera similar usando DIBAC-PEG_{12}-tioéster.

La figura 5 muestra el análisis mediante SDS-PAGE (condiciones reductoras) de (1) Fc6 sin modificar, (2) el producto de reacción Az-DKTHT-Fc6 de la figura 3, y (3) el producto de reacción Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 de la figura 4.

La figura 6 muestra la síntesis de TNR1B-alquino-azida-Fc6 mediante ligación (distinta de peptidilo) de TNR1B modificado con alquino y Az-DKTHT-Fc6.

La figura 7 muestra la síntesis de TNR1B-alquino-azida-PEG_n-Fc6 mediante ligación (distinta de peptidilo) de TNR1B modificado con alquino y azida-PEG_n-DKTHT-Fc6. En este ejemplo, n = 4.

La figura 8 muestra el análisis mediante SDS-PAGE (condiciones reductoras) de (1) TNR1B modificado con alquino solo, (2) TNR1B modificado con alquino + Az-DKTHT-Fc6 en ausencia de catalizador, (3) TNR1B modificado con alquino + Az-DKTHT-Fc6 + catalizador que conduce al producto de la figura 6, y (4) TNR1B modificado con alquino dializado + Az-DKTHT-Fc6 + catalizador que conduce a la formación aumentada del producto de la figura 6, (5) TNR1B modificado con alquino + Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 en ausencia de catalizador, (6) TNR1B modificado con alquino + Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 + catalizador que conduce al producto de la figura 7, y (7) TNR1B modificado con alquino dializado + Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 + catalizador que conduce a la formación aumentada del producto de la figura 7. Las flechas corresponden a (a) Mr ~75.000, (b) Mr ~65.000, (c) Mr ~43.000 y (d) Mr ~28.000.

La figura 9 muestra el análisis mediante SDS-PAGE (condiciones reductoras) de (1) proteína de fusión de TNF1B-Fc (etanercept) sola, (2) TNR1B modificado con alquino + Az-DKTHT-Fc6 + catalizador que conduce al producto de la figura 6, (3) proteína de fusión de TNF1B-Fc (etanercept), y (4) TNR1B modificado con alquino + Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 que conduce al producto de la figura 7. Las flechas corresponden a (a) Mr ~75.000, (b) Mr ~65.000, (c) Mr

~43.000, y (d) Mr ~28.000.

La figura 10 muestra el análisis mediante SDS-PAGE (condiciones reductoras) de (1) Fc6 sin modificar + catalizador, (2) TNR1B modificado con alquino + Fc6 sin modificar + catalizador (3) Az-DKTHT-Fc6 + catalizador, (4) TNR1B modificado con alquino + Az-DKTHT-Fc6 + catalizador que conduce al producto de la figura 6, y (5) TNR1B modificado con alquino solo. Las flechas corresponden a (a) Mr ~75.000, (b) Mr ~65.000, (c) Mr ~43.000, (d) Mr ~28.000, y (e) Mr ~27.000.

La figura 11 muestra péptido tríptico identificado mediante CL/EM en el producto TNR1B-alquino-azida-DKTHT-Fc6 (Mr ~75.000) de la figura 10. Las secuencias de péptido subrayadas son las identificadas mediante CL/EM que se derivan de las secuencias originales de TNR1B (superior) y Fc6 (inferior).

La figura 12 muestra el análisis mediante SPR de unión a TNF-□ mediante los productos de reacción TNR1B-alquino-azida-DKTHT-Fc6 (panel izquierdo) y TNR1B-alquino-azida-PEG_4-DKTHT-Fc6 (panel derecho) de la figura 9. Los datos de unión cinética se resumen en la tabla 2.

La figura 13 muestra la preparación de Fab' de adalimumab en un procedimiento en tres etapas: 1) escisión de IdeS para dar los fragmentos Fab'2 + Fc', 2) cromatografía con proteína A para retirar el fragmento Fc', y 3) reducción leve del fragmento Fab'2 para dar el fragmento Fab' con 2-mercaptoetilamina (MEA).

La figura 14 muestra el análisis mediante SDS-PAGE de (1) adalimumab, (2) adalimumab después de la escisión de IdeS, (3) Fab'2 de adalimumab después de la purificación con proteína A, (4) Fab' de adalimumab después del tratamiento con MEA del Fab'2 purificado con proteína A, (5) Fab'2 de adalimumab después de la purificación con proteína A, y (6) Fab' de adalimumab después del tratamiento con MEA del Fab'2 purificado con proteína A. Las muestras en los carriles 1, 2, 5 y 6 fueron el análisis en condiciones reductoras; mientras que las muestras en los carriles 3 y 4 se analizaron en condiciones no reductoras. Las flechas corresponden a (a) cadena pesada, (b) fragmento Fc' de cadena pesada, (c) fragmento Fd' de cadena pesada (que contiene región variable), y (d) cadena ligera.

La figura 15 muestra la preparación de Fab' modificado con cicloalquino mediante la reacción de Fab' de adalimumab con DIBAC-PEG_y-Lys (Mal). En este ejemplo, PEG_y = PEG_{12}.

La figura 16 muestra el análisis mediante SDS-PAGE (condiciones no reductoras) de la síntesis y purificación de Fab' de adalimumab modificado con cicloalquino. El panel superior muestra la reacción a (1-6) pH 7,4 y (7-12) pH 7,0. La ración de DIBAC-PEG_y-Lys(Mal) con respecto a Fab' fue de (1) 0, (2) 10:1, (3) 5:1, (4) 2,5:1, (5) 1,2:1, (6) 0,6:1, (7) 0, (8) 10, (9) 5, (10) 2,5, (11) 1,2, y (12) 0,6:1. El panel inferior muestra (1) Fab' sin reaccionar, (2) a (12) fracciones de flujo a través de proteína L que sólo contienen el Fab' modificado con cicloalquino.

La figura 17 muestra el análisis mediante SDS-PAGE (condiciones reductoras) de (1) Fc6, (2) Az-DKTHT-Fc6, (3) Az-PEG_{12}-DKTHT-Fc6, (4) Az-PEG_{24}-DKTHT-Fc6, y (5) Az-PEG_{36}-DKTHT-Fc6.

La figura 18 muestra la cromatografía de exclusión molecular de (a) Az-PEG_{36}-DKTHT-Fc6, (b) Az-PEG_{24}-DKTHT-Fc6, (c) Az-PEG_{12}-DKTHT-Fc6, (d) Az-DKTHT-Fc6, y (e) Fc6.

La figura 19 muestra la síntesis de Fab'-PEG_y-alquino-azida-PEG_x-Fc6 mediante ligación (distinta de peptidilo) de Fab' de adalimumab modificado con cicloalquino y Fc6 modificado con azida.

La figura 20 muestra la serie de productos de Fab'-PEG_y-alquino-azida-PEG_x-Fc6.

La figura 21 muestra el análisis mediante SDS-PAGE de (1) anticuerpo completo de adalimumab, (2) Fab' de adalimumab, (3) Fab'-PEG_{12}-alquino, (4) Fab'-PEG_{12}-alquino + Az-DKTHT-Fc6, (5) Az-DKTHT-Fc6, (6) Fab'-PEG_{12}-alquino + Az-PEG_{12}-DKTHT-Fc6, (7) Az-PEG_{12}-DKTHT-Fc6, (8) Fab'-PEG_{12}-alquino + Az-PEG_{24}-DKTHT-Fc6, (9) Az-PEG_{24}-DKTHT-Fc6 solo, (10) Fab'-PEG_{12}-alquino + Az-PEG_{36}-DKTHT-Fc6, (11) Az-PEG_{36}-DKTHT-Fc6, y (12) Fc6. Se hicieron correr las muestras en condiciones reductoras (panel superior) y condiciones no reductoras (panel inferior). En el panel superior la flecha muestra (a) cadena pesada de Fab'-PEG_y-alquino-azida-PEG_x-Fc6. En los paneles inferiores las flechas muestran (a) moléculas de Fab'-PEG_y-alquino-azida-PEG_x-Fc6 de dos manos, y (b) moléculas de Fab'-PEG_y-alquino-azida-PEG_x-Fc6 de una mano.

La figura 22 muestra la cromatografía de exclusión molecular (SEC) de productos de reacción de dos manos: (a) Fab'-PEG_{12}-alquino-azida-PEG_{36}-DKTHT-Fc6, (b) Fab'-PEG_{12}-alquino-azida-PEG_{24}-DKTHT-Fc6, (c) Fab'-PEG_{12}-alquino-azida-PEG_{12}-DKTHT-Fc6, (d) Fab'-PEG_{12}-alquino-azida-DKTHT-Fc6, y (e) adalimumab completo.

La figura 23 muestra la inhibición de la citotoxicidad de TNF-α sobre células WEHI mediante productos de reacción. El panel superior muestra (a) control de Fc6, (b) Fab' modificado con cicloalquino, (c) Fab-PEG_{12}-alquino-azida-DKTHT-Fc6, y (d) Fab'-PEG_{12}-alquino-azida-PEG_{12}-DKTHT-Fc6. El panel inferior muestra (a) control de Fc6, (b) Fab' modificado con cicloalquino, (c) Fab'-PEG_{12}-alquino-azida-PEG_{24}-DKTHT-Fc6, y (d) Fab'-PEG_{12}-alquino-azida-PEG_{36}-DKTHT-Fc6.

La figura 24 muestra las proteínas de N_3-Px-Fc purificadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), N_3-P0-Fc (carriles b), N_3-P12-Fc (carriles c), N_3-P24-Fc (carriles d), N_3-P36-Fc (carriles e), y N_3-P48-Fc (carriles f).

La figura 25 muestra la estructura y síntesis del análogo de GLP-1 modificado con ciclooctino (GLP1-P7-DBCO).

La figura 26 muestra la reacción entre GLP1-P7-DBCO y las proteínas de N_3-Px-Fc.

La figura 27 muestra la estructura de inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc.

La figura 28 muestra las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc purificadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y condiciones no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), GLP1-P4-DN-P0-Fc (carriles b), GLP1-P4-DN-P12-Fc (carriles c), GLP1-P4-DN-P24-Fc (carriles d), GLP1-P4-DN-P36-Fc (carriles e), y GLP1-P4-DN-P48-Fc (carriles f).

La figura 29 compara directamente las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc y proteínas de N_3-Px-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: control de Fc6 (carril a), N_3-P0-Fc (carril b), GLP1-P4-DN-P0-Fc (carril c), N_3-P12-Fc (carril d), GLP1-P4-DN-P12-Fc (carril e), N_3-P24-Fc (carril f), GLP1-P4-DN-P24-Fc (carril g), N_3-P36-Fc (carril h), GLP1-P4-DN-P36-Fc (carril i), N_3-P48-Fc (carril j), GLP1-P4-DN-P48-Fc (carril k).

La figura 30 compara la inducción de la síntesis de cAMP en células que expresan receptor de GLP-1 mediante inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc y GLP-1.

La figura 31 muestra la reacción entre DIBAC-PEG_{11}-DIBAC y las proteínas de N_3-Px-Fc.

La figura 32 muestra la estructura de las proteínas de ciclooctino-Px-Fc.

La figura 33 muestra el producto de reacción de DIBAC-P11-DN-P0-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: control de Fc6 (carril b), producto de reacción sin purificar (carriles c-e), la proteína N3-P0-Fc purificada (carril f), y la proteína DIBAC-P11-DN-P0-Fc purificada (carril g).

La figura 34 muestra la reacción entre ADN modificado con azida y las proteínas de ciclooctino-Px-Fc.

La figura 35 muestra la estructura de inmunoglobulinas híbridas de ADN-triazol-Fc.

La figura 36 muestra los productos de reacción de inmunoglobulinas híbridas de ADN-triazol-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: la concentración de oligonucleótido 5AzD-let7d (mg/ml) fue de la siguiente manera: marcadores (carril a), 0 (carril b), 2,5 (carril c), 1,25 (carril d), 0,063 (carril e), 0,031 (carril f), 0,016 (carril g), 0,08 (carril h).

La figura 37 muestra la estructura y síntesis de la variante de trastuzumab, cys1H-IgG1, y la cadena pesada de trastuzumab modificado con azida (N_3-Px-Hc).

La figura 38 muestra la estructura y síntesis de la variante de trastuzumab, cys1L-IgG1, la cadena ligera de trastuzumab modificado con azida (N_3-Px-Lc).

La figura 39 muestra la estructura y síntesis de DM-1 modificado con ciclooctino (DM1-P4-DBCO).

La figura 40 muestra la reacción entre DM-1 modificado con ciclooctino y las proteínas de N_3-Px-Hc.

La figura 41 muestra la estructura de inmunoglobulinas híbridas de DM1-P4-triazol-Px-Hc.

La figura 42 muestra la reacción entre DM-1 modificado con ciclooctino y las proteínas de N_3-Px-Lc.

La figura 43 muestra la estructura de inmunoglobulinas híbridas de DM1-P4-triazol-Px-Lc.

La figura 44 muestra la reacción entre tetrazina-DBCO y las proteínas de N_3-Px-Fc.

La figura 45 muestra la estructura de proteínas de Fc modificadas con tetrazina (Tet-Px-Fc).

La figura 46 muestra las proteínas de Tet-Px-Fc purificadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), Tet-P0-Fc (carriles b), Tet-P12-Fc (carriles c), Tet-P24-Fc (carriles d), Tet-P36-Fc (carriles e), y Tet-P48-Fc (carriles f).

La figura 47 muestra la reacción entre TCO-PEG_{12}-DBCO y las proteínas de N_3-Px-Fc.

La figura 48 muestra la estructura de proteínas de Fc modificadas con transcicloocteno (Tco-Px-Fc).

La figura 49 muestra las proteínas de Tco-P12-Px-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: la concentración de grupo de unión Tco-P12-DBCO (mg/ml) fue de la siguiente manera: 32 (carril a), 16 (carril b), 8 (carril

c), 4 (carril d), 2 (carril e), 1 (carril f), 0,5 (carril g), 0,25 (carril h), 0,125 (carril i), y 0 (carril j).

La figura 50 muestra los productos de reacción entre NH_2-PEG_{23}-N_3 y proteína DBCO-TT-P12-P36-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: la concentración de grupo de unión NH_2-PEG_{23}-N_3 (mg/ml) fue de la siguiente manera: 0,12 (carril a), 0,06 (carril b), 0,03 (carril c), 0,015 (carril d), 0,0075 (carril e), 0,0038 (carril f), 0,002 (carril g), 0,001 (carril h), 0 (carril i).

La figura 51 muestra la estructura y síntesis del análogo de GLP-1 modificado con transciclooctено (GLP1-P6-Tco).

La figura 52 muestra la reacción entre péptido GLP1-P6-Tco y las proteínas de Tet-Px-Fc.

La figura 53 muestra la estructura de las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc.

La figura 54 muestra la estructura y síntesis del análogo de GLP-1 modificado con tetrazina (GLP1-P6-Tet).

La figura 55 muestra la reacción entre péptido GLP1-P6-Tet y las proteínas de Tco-Px-Fc.

La figura 56 muestra la estructura de las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-P6-TT-Px-Fc.

La figura 57 muestra las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc purificadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y condiciones no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), GLP1-P6-TT-P0-Fc (carriles b), GLP1-P6-TTP12-Fc (carriles c), GLP1-P6-TT-P24-Fc (carriles d), GLP1-P6-TT-P36-Fc (carriles e), y GLP1-P6-TT-P48-Fc (carriles f).

La figura 58 compara directamente las proteínas de N_3-Px-Fc (I), las proteínas de Tet-Px-Fc (II), y las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc (III) mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: control de Fc6 (carril a), N_3-P0-Fc (carril b), Tet- P0-Fc (carril c), GLP1-P6-TT-P0-Fc (carril d), N_3-P12-Fc (carril e), Tet-P12-Fc (carril f), GLP1-P6-TT-P12-Fc (carril g), N_3-P24-Fc (carril h), Tet-P24-Fc (carril i), GLP1-P6-TT-P24-Fc (carril j), N_3-P36-Fc (carril k), Tet-P36-Fc (carril l), GLP1-P6-TT-P36-Fc (carril m), N_3-P48-Fc (carril n), Tet-P48-Fc (carril o), GLP1-P6-TT-P48-Fc (carril p).

La figura 59 muestra un transcurso de tiempo para la reacción de GLP1-P7-DBCO con N_3-P36-Fc y un transcurso de tiempo para la reacción de GLP1-P6-Tco con Tet-P36-Fc.

La figura 60 compara la inducción de la síntesis de cAMP en células que expresan receptor de GLP-1 mediante inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc y GLP-1.

La figura 61 muestra la estructura y síntesis del Fab de adalimumab modificado con transciclooctено (Fab-P3-Tco).

La figura 62 muestra la reacción entre proteína Fab-P3-Tco y las proteínas de Tet-Px-Fc.

La figura 63 muestra la estructura de las inmunoglobulinas híbridas de Fab-dihidropiridizina-Fc.

La figura 64 muestra las inmunoglobulinas híbridas de Fab-dihidropiridizina-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: marcadores (carriles a), adalimumab (carril b), Fab-P3-TT-P0-Fc (carril c), Fab-P3-TT-P12-Fc (carril d), Fab-P3-TT-P24-Fc (carriles e), Fab-P3-TT-P36-Fc (carriles f), Fab-P3-TT-P48-Fc (carril g), Fab-P3-Tco (carril h), Tet-P0-Fc (carril i), Tet- P12-Fc (carril j), Tet-P24-Fc (carril k), Tet-P36-Fc (carril l), Tet-P48-Fc (carril m).

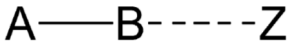
La figura 65 muestra la estructura y síntesis de olanzapina modificada con azida y modificada con transciclooctено (Ola-P12-Tco).

La figura 66 muestra la reacción entre Ola-P12-Tco y las proteínas de Tet-Px-Fc.

La figura 67 muestra la estructura de inmunoglobulinas híbridas de olanzapina-dihidropiridizina-Fc.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto no cubierto por la presente invención, la memoria descriptiva describe un compuesto que tiene la estructura:



en la que A es una estructura biológicamente activa del compuesto;

en la que Z es un componente de proteína del compuesto, componente de proteína que comprende uno o más polipéptidos, en el que al menos uno de los uno o más polipéptidos comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una cisteína o una selenocisteína;

en la que B es una estructura química que une A y Z;

en la que la línea discontinua entre B y Z representa una unión peptidilo; y

en la que la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo.

En algunos aspectos, la cisteína o selenocisteína se produce de manera natural en el tramo de aminoácidos consecutivos. En algunos aspectos, la cisteína o selenocisteína no se produce de manera natural en el tramo de aminoácidos consecutivos.

En algunos aspectos, los aminoácidos consecutivos tienen en su extremo N-terminal una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cisteína, selenocisteína, CP, CPXCP (en la que X = P, R o S), CDKTHTCPPCP, CVECPPCP, CCVECPPCP y CDTPPPCPRCP.

En algunos aspectos, el dominio Fc de un anticuerpo es un dominio Fc que se produce de manera natural de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el dominio Fc de un anticuerpo es un dominio Fc variante de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el dominio Fc variante de un anticuerpo es un dominio Fc mutado de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el dominio Fc mutado es un mutante de sustitución.

En algunos aspectos, el mutante de sustitución tiene una sustitución de aminoácido en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o en una posición del dominio Fc distinta del extremo N-terminal o el extremo C-terminal.

En algunos aspectos, el mutante de sustitución tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 sustituciones de aminoácido en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

En algunos aspectos, las sustituciones son sustituciones de aminoácido conservativas.

En algunos aspectos, el dominio Fc mutado es un mutante de adición de aminoácido.

En algunos aspectos, el mutante de adición de aminoácido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 aminoácidos añadidos en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

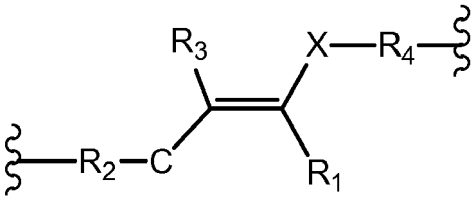
En algunos aspectos, el dominio Fc mutado es un mutante de deleción de aminoácido.

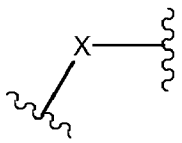
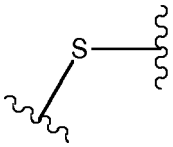
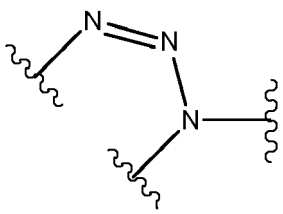
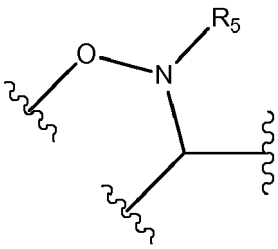
En algunos aspectos, el mutante de deleción de aminoácido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 aminoácidos delecionados en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

En algunos aspectos, los aminoácidos consecutivos son idénticos a un tramo de al menos 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 o 190 aminoácidos consecutivos presente en la cadena del dominio Fc del anticuerpo.

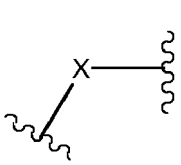
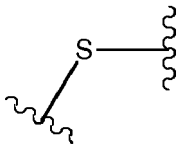
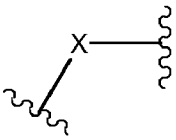
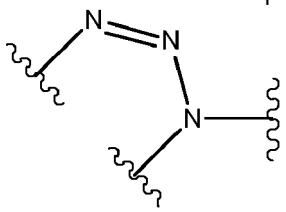
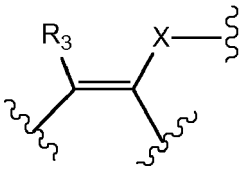
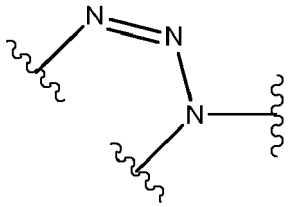
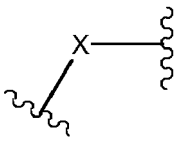
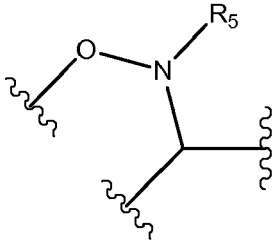
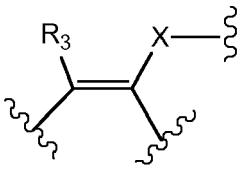
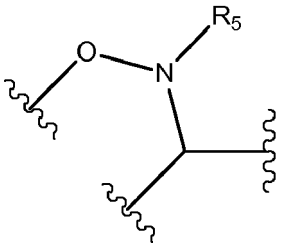
En algunos aspectos, los aminoácidos consecutivos son idénticos al tramo de aminoácidos en la región de bisagra, la región CH2 o la región CH3 del dominio Fc o una porción de las mismas.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



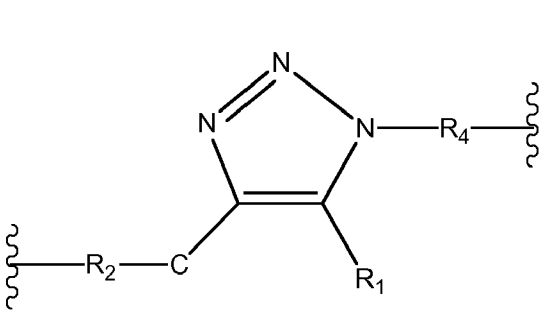
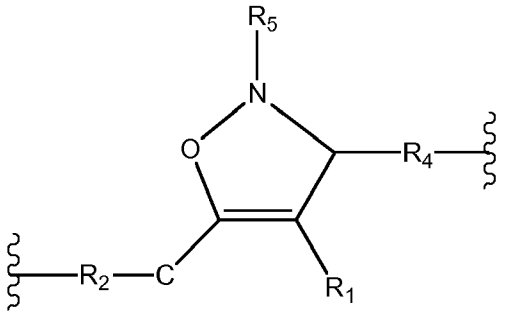
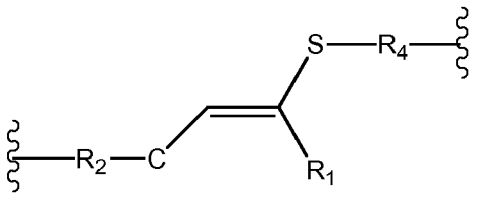
en la que  es  ,  o  en el que R_5 es un grupo alquilo o arilo

en la que R_1 es H o forma parte de una estructura adicional que es una estructura cíclica, en la que la estructura cíclica adicional comprende R_1 o una porción de R_1, y también puede comprender R_2 o una porción de R_2, y el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno;

con la condición de que si  es  , R_3 es un H; si  es  ,  es un anillo de triazol que comprende  , y si  es  ,  es un anillo de isoxazolina sustituido con N-alquilo o arilo que comprende  ; y

en la que R_2 representa una estructura orgánica que se conecta a uno de A o B y R_4 representa una estructura orgánica que se conecta al otro de A o B.

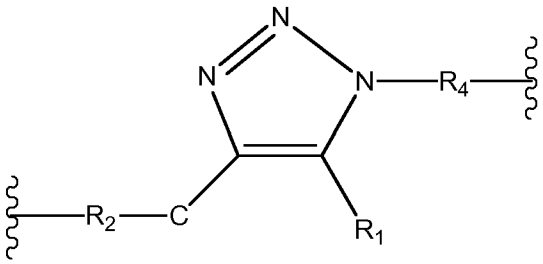
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:

 ,  , o  ,

en la que R_1 es H o forma parte de una estructura adicional que es una estructura cíclica, en la que la estructura cíclica

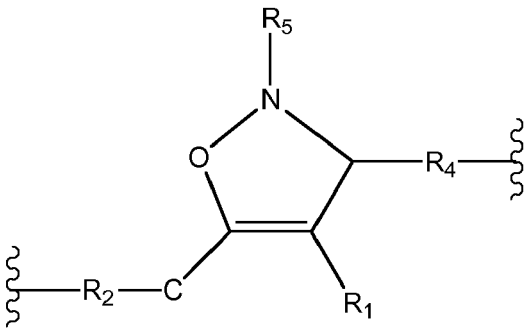
adicional comprende R_1 o una porción de R_1, y también puede comprender R_2 o una porción de R_2, y el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



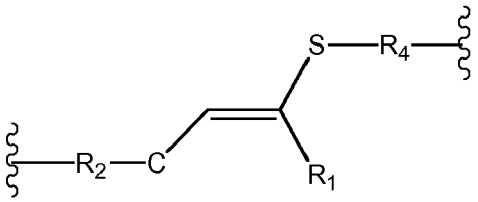
en la que R_1 es H o forma parte de una estructura adicional que es una estructura cíclica, en la que la estructura cíclica adicional comprende R_1 o una porción de R_1, y también puede comprender R_2 o una porción de R_2, y el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



en la que R_1 forma parte de una estructura adicional que es una estructura cíclica, en la que la estructura cíclica adicional comprende R_1 o una porción de R_1, y también puede comprender R_2 o una porción de R_2, y el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



en la que R_1 forma parte de una estructura adicional que es una estructura cíclica, en la que la estructura cíclica adicional comprende R_1 o una porción de R_1, y también puede comprender R_2 o una porción de R_2, y el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno.

En algunos aspectos, R_1 y R_2 están unidos mediante al menos un enlace directo para formar una estructura cíclica que comprende

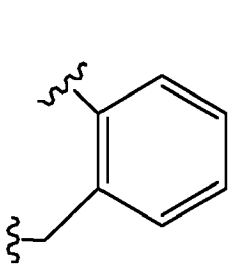
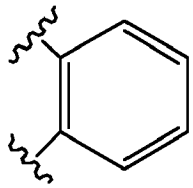
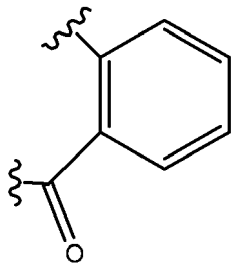
i) una porción de R_1,

ii) una porción de R_2,

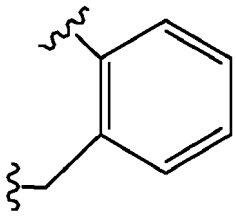
iii) el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno, y

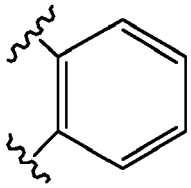
iv) el doble enlace de alqueno.

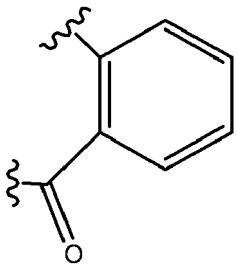
En algunos aspectos, R_1 se selecciona del grupo que consiste en:


, 
y 
,

que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, R_1 es  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, R_1 es  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, R_1 es  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno está:

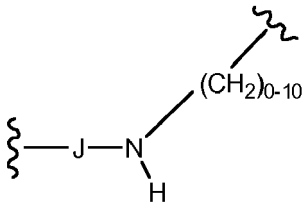
(i) directamente unido a R_2 con un enlace sencillo y sustituido con dos sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, bencilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxilo opcionalmente sustituido; o

(ii) directamente unido a R_2 mediante un doble enlace y un enlace sencillo.

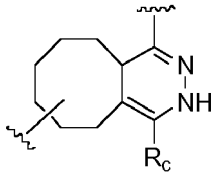
En algunos aspectos, el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno está sustituido con dos hidrógenos y directamente unido a R_2 con un enlace sencillo.

En algunos aspectos, el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno está directamente unido a R_2 mediante un doble enlace y un enlace sencillo.

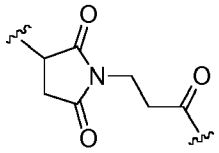
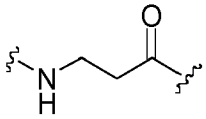
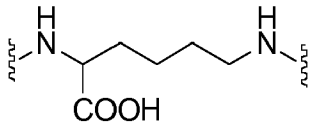
En algunos aspectos, el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno está directamente unido a R_2 mediante un doble enlace y un enlace sencillo para formar un anillo de fenilo que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, R_2 es  , en el que R_2 está unido a A o B mediante J, y

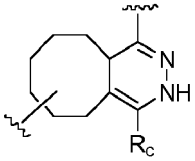
en el que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a

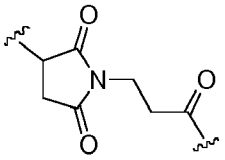
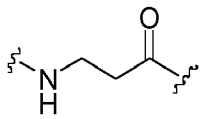
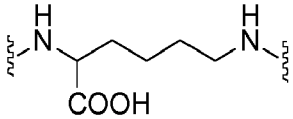


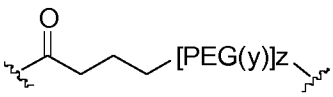
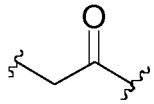
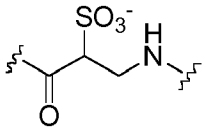
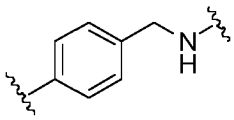
una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

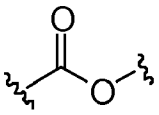
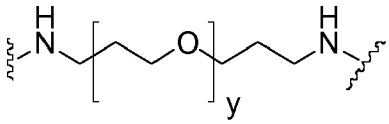
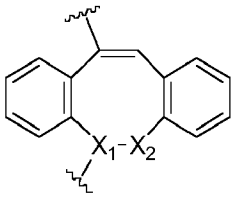

,

,

,

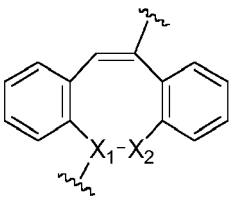
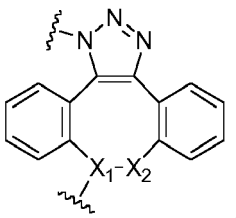
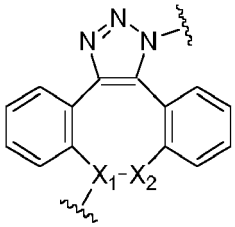
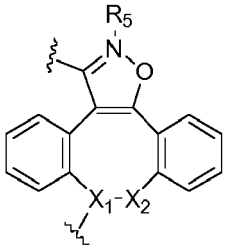
en el que R_2 está unido a R_1 mediante el átomo de nitrógeno de R_2, y

en el que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctano, un dibenzoazaciclooctano,  ,

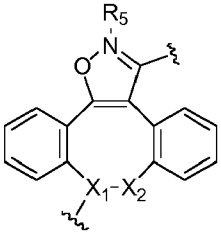
 ,  ,  ,

 ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,

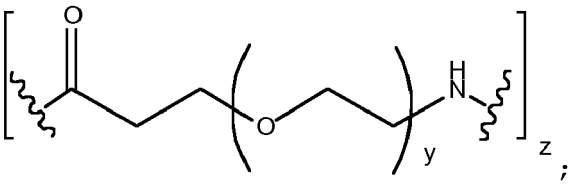
 ,  ,  ,  ,

y

 ;

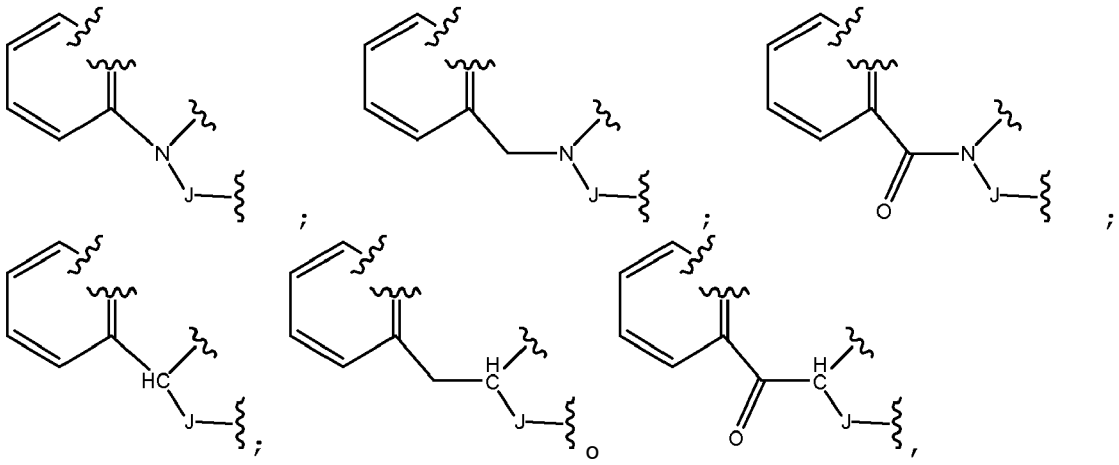
en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en el que [PEG(y)]z es:

 ;

en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunos aspectos, R_2 es



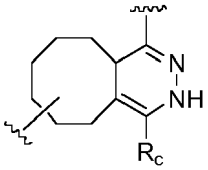
que está opcionalmente sustituido en cualquier posición,

en el que R_2 está unido a R_1 mediante el átomo de nitrógeno o carbono de R_2,

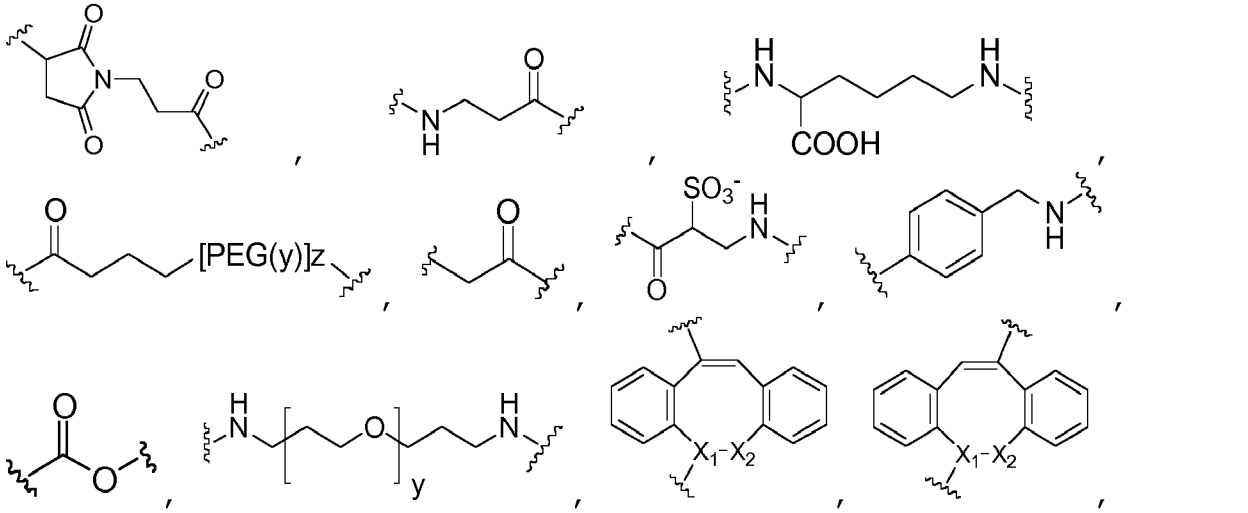
en el que R_2 está unido a A o B mediante J,

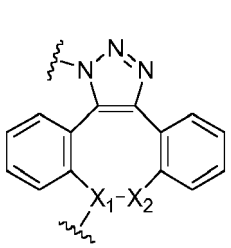
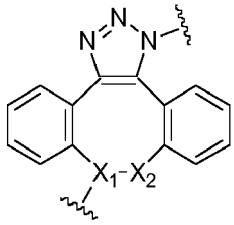
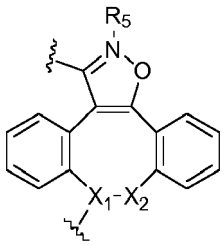
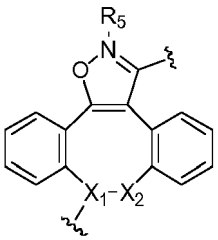
y

en el que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a



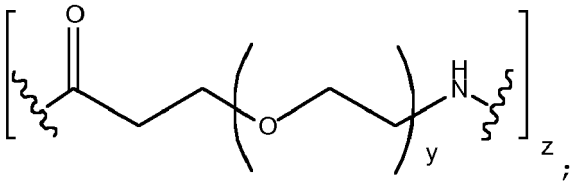
una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



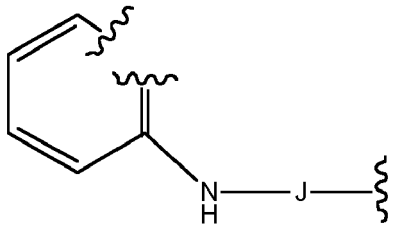



y

;

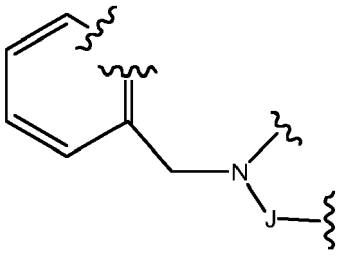
en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

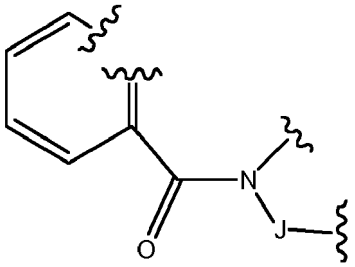
en el que [PEG(y)]z es:

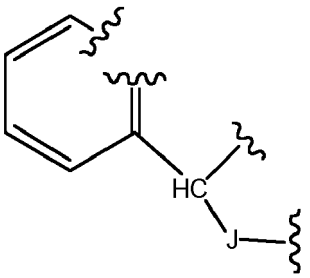

;

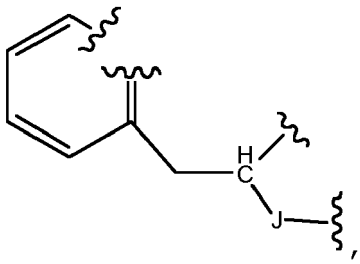
en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunos aspectos, R_2 es  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

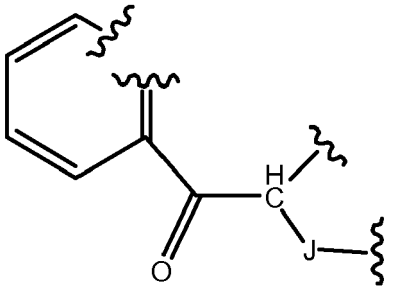
En algunos aspectos, R_2 es  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, R_2 es  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, R_2 es  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

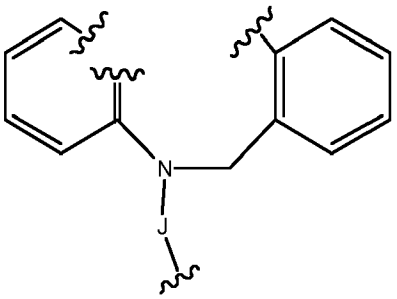


En algunos aspectos, R_2 es , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

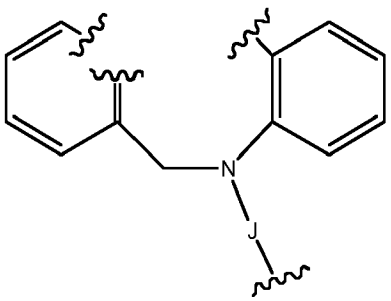


En algunos aspectos, R_2 es , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

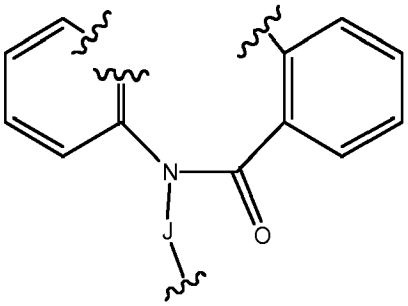
En algunos aspectos, R_1 y R_2 tomados juntos son:



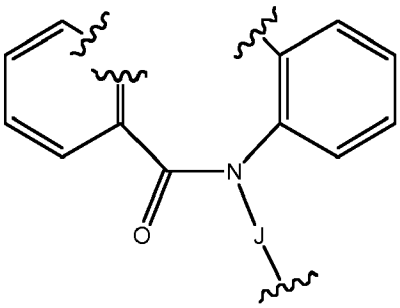
;



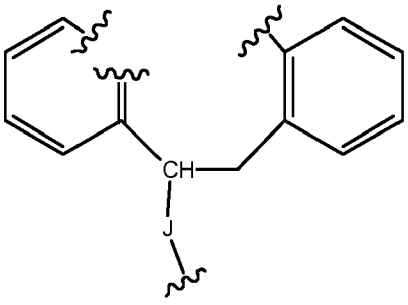
;



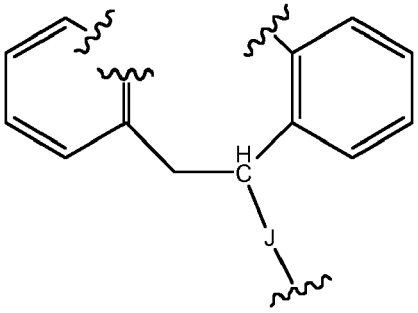
;



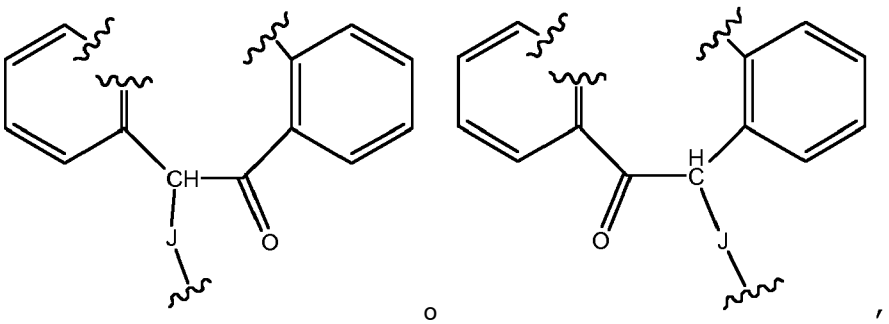
;



;



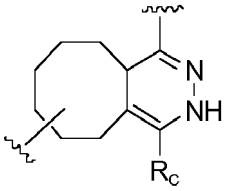
;



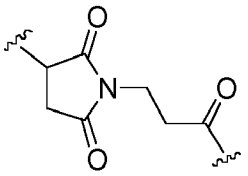
o ,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición,

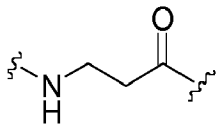
en los que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en los que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a



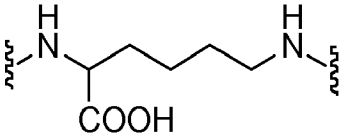
una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



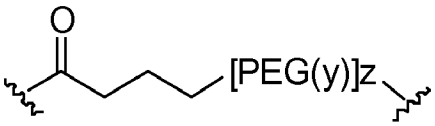
,



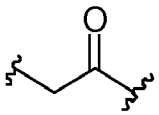
,



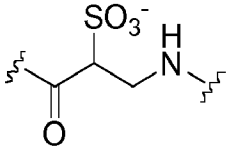
,



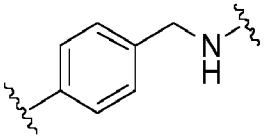
,



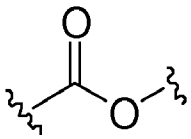
,



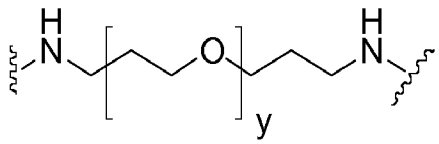
,



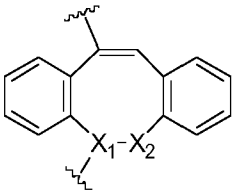
,



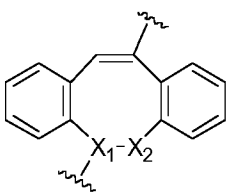
,



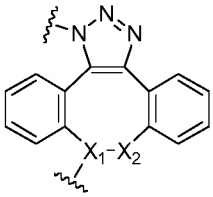
,



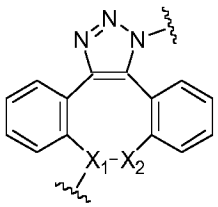
,



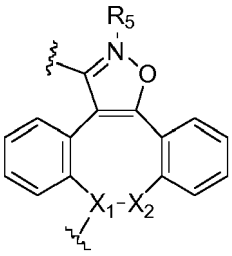
,



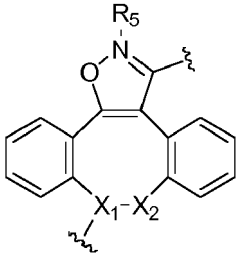
,



,



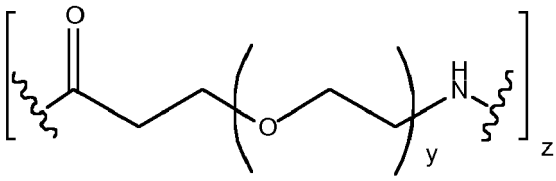
y



;

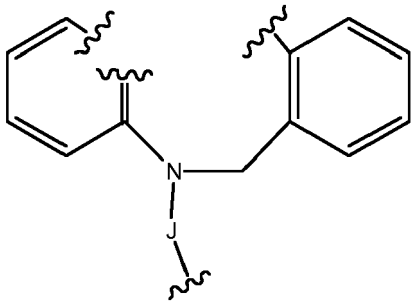
en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

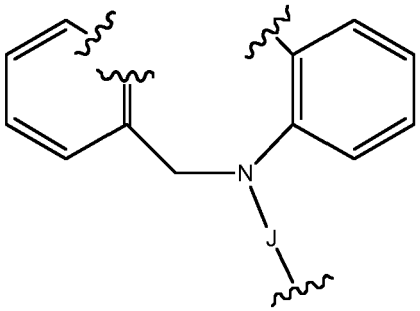
en los que [PEG(y)]z es:



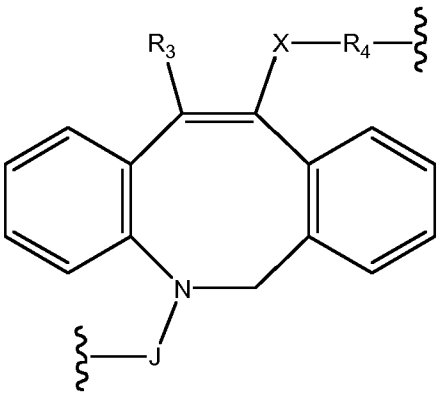
;

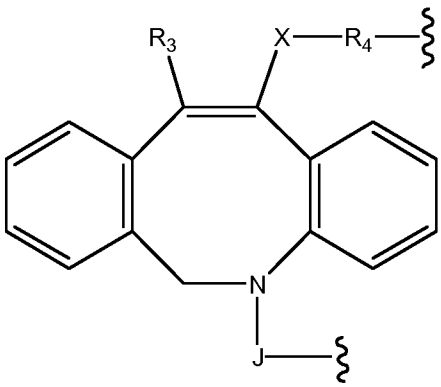
en el que y = 1-100 y z = 1-10.

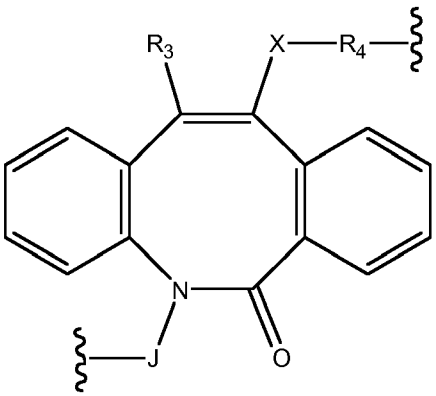
En algunos aspectos, R_1 y R_2 tomados juntos son  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

En algunos aspectos, R_1 y R_2 tomados juntos son  , que está opcionalmente sustituido en cualquier posición.

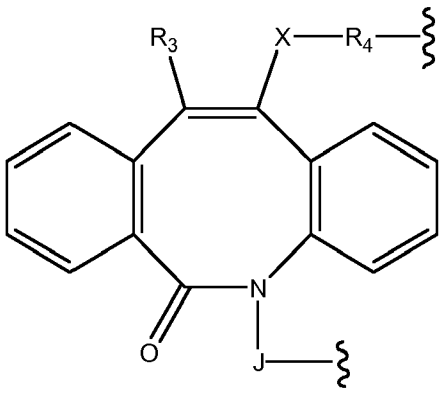
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:

 ;

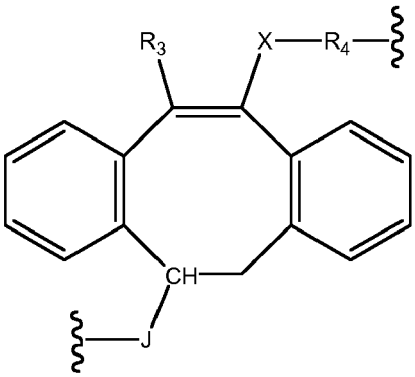
 ;



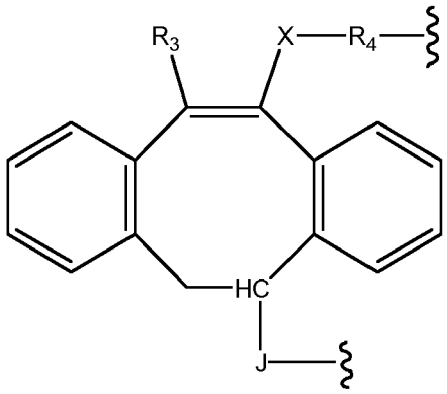
;



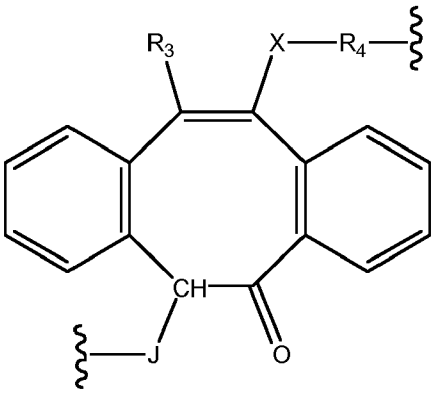
;



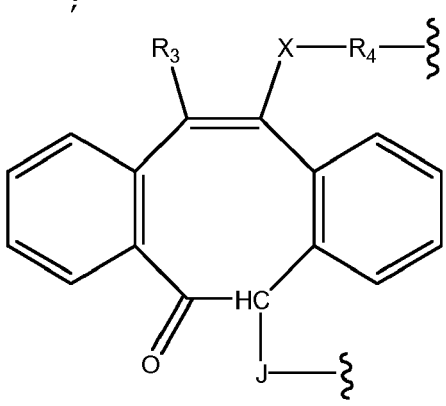
;



;



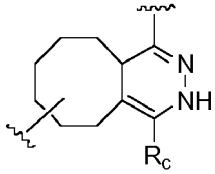
o



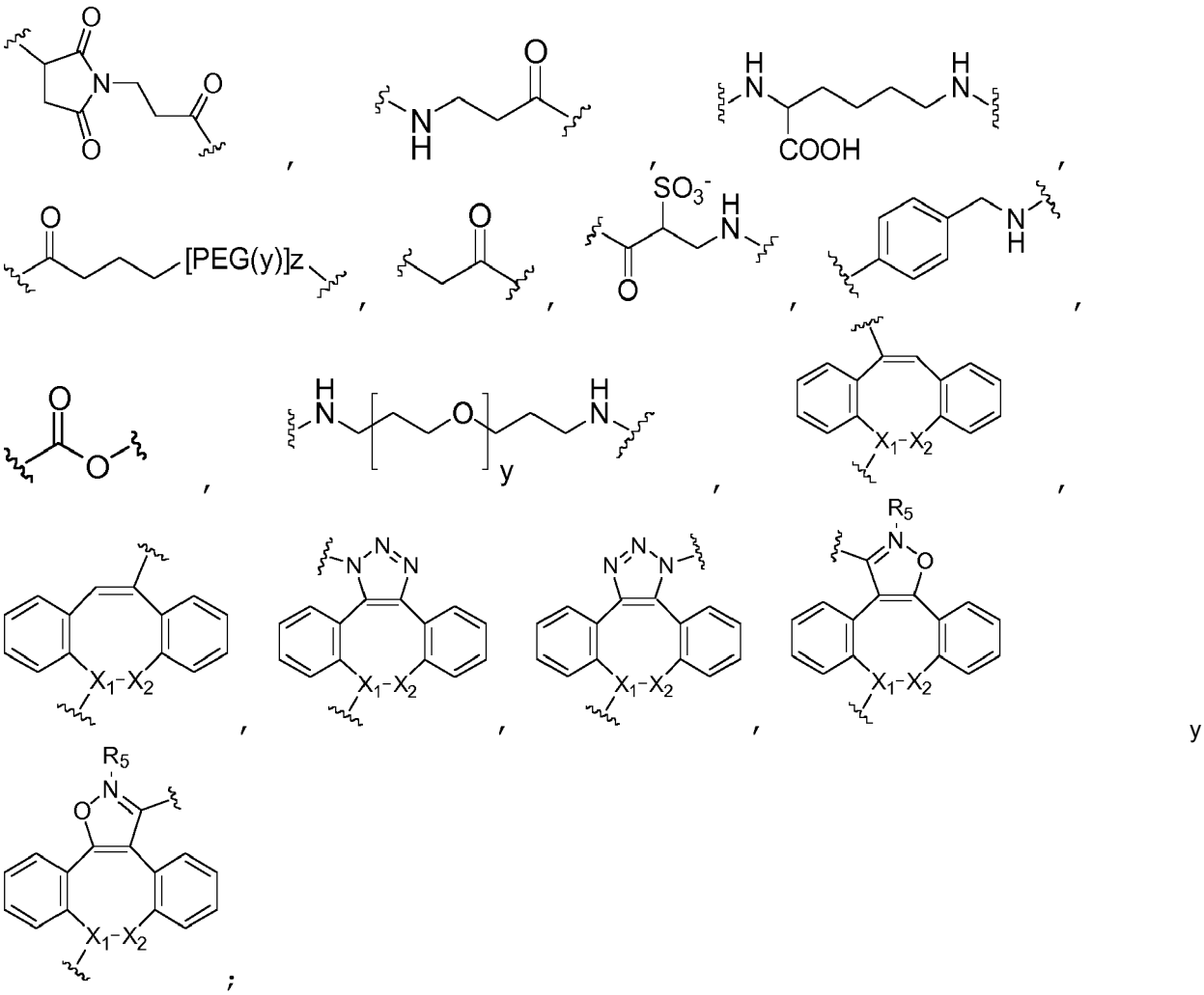
,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición,

en la que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a

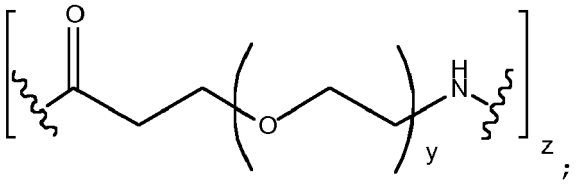


una isoxazolidina, un dibenzocicloocteno, un dibenzoazacicloocteno, ,



en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

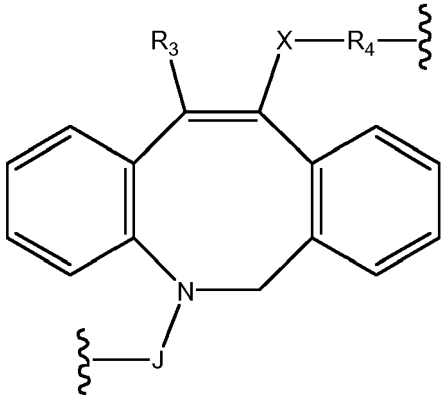
en el que [PEG(y)]z es:



;

en el que y = 1-100 y z = 1-10.

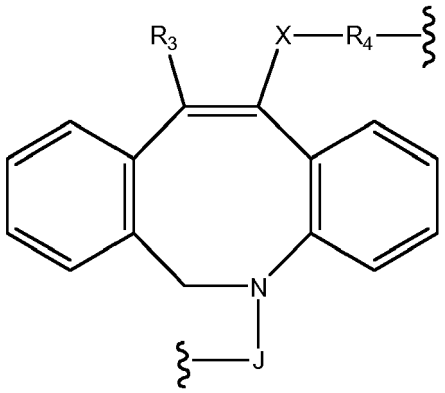
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

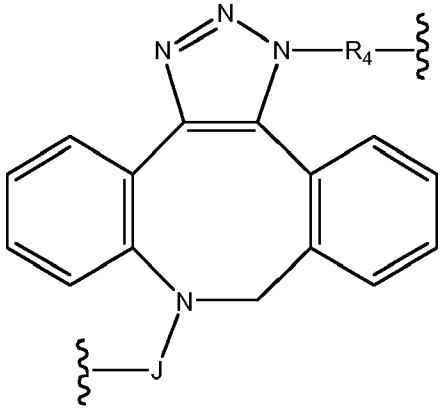
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



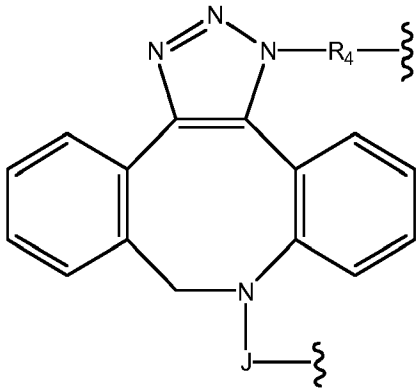
,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

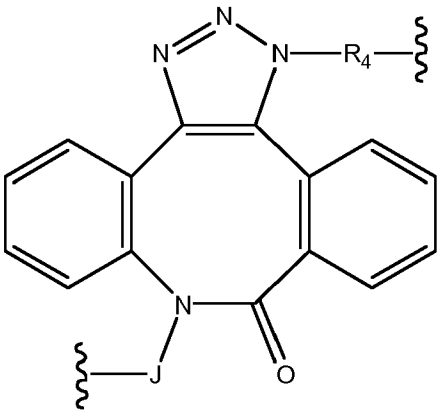
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



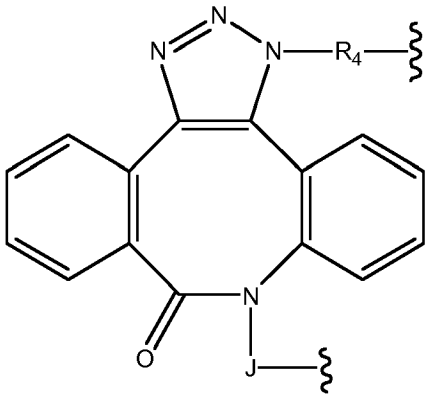
;



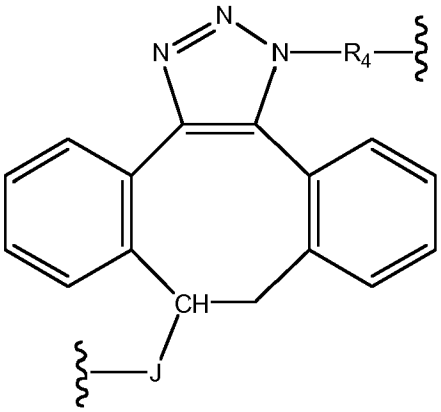
;



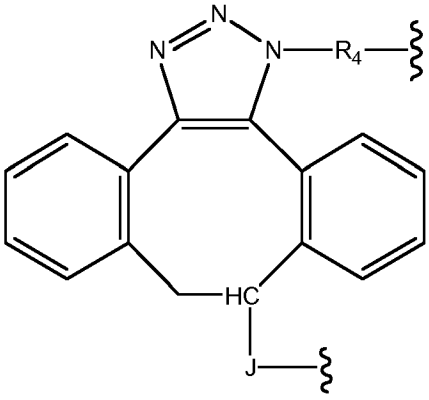
;



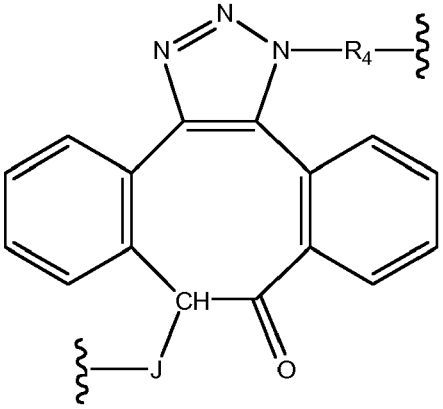
;



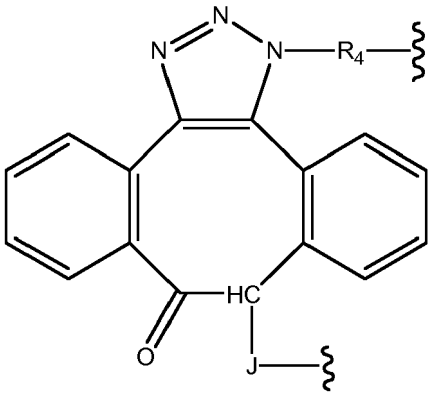
;



;



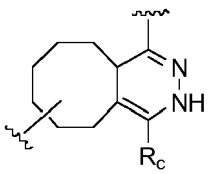
o



,

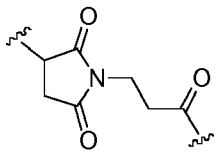
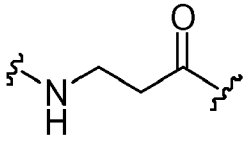
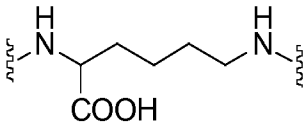
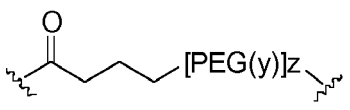
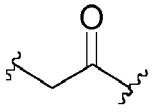
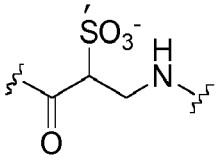
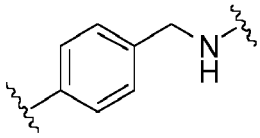
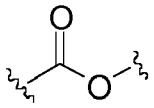
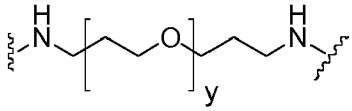
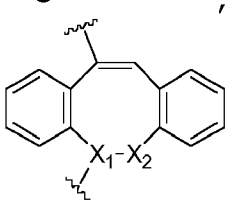
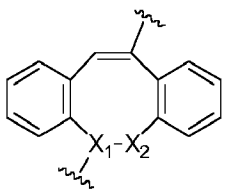
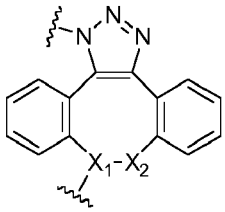
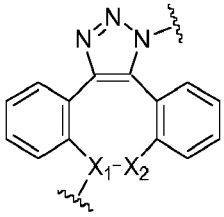
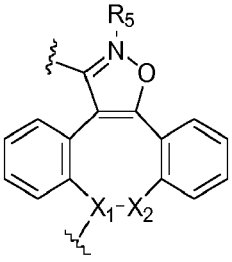
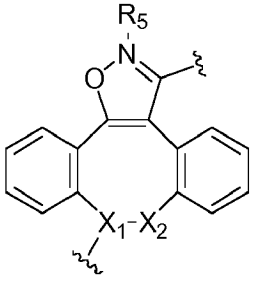
que está opcionalmente sustituida en cualquier posición,

en la que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en la que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a



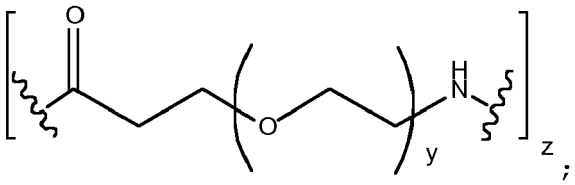
una isoxazolidina, un dibenzocicloocteno, un dibenzoazacicloocteno,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

y

;

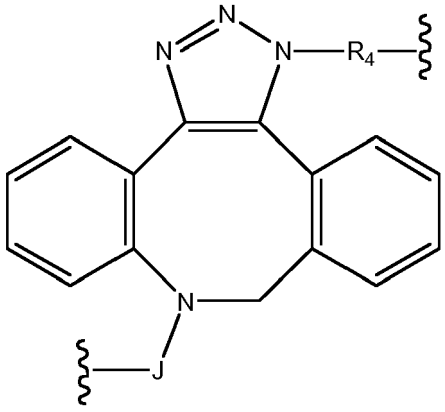
en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en la que [PEG(y)]z es:


;

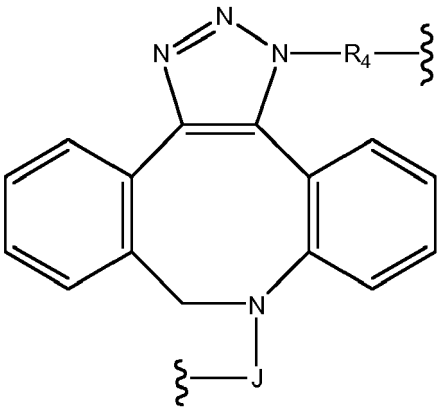
en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:


,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

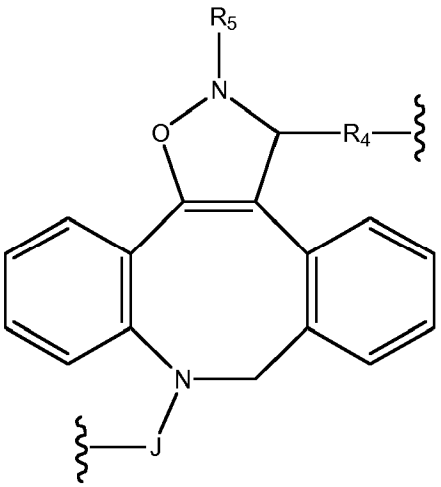
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



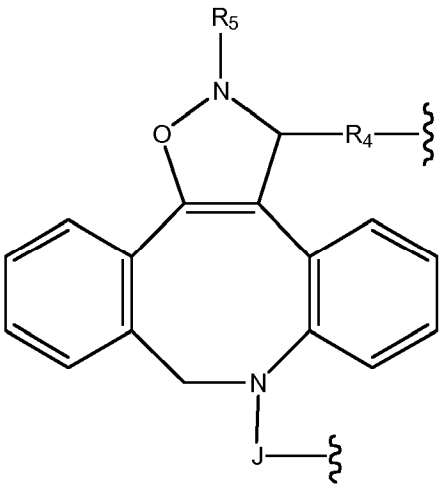
,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

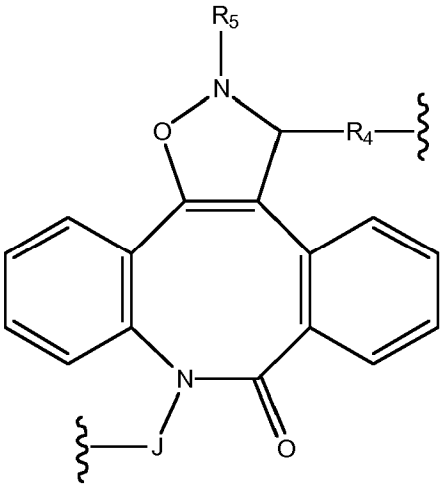
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



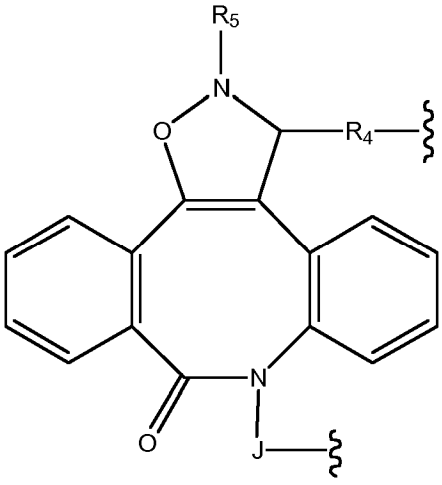
;



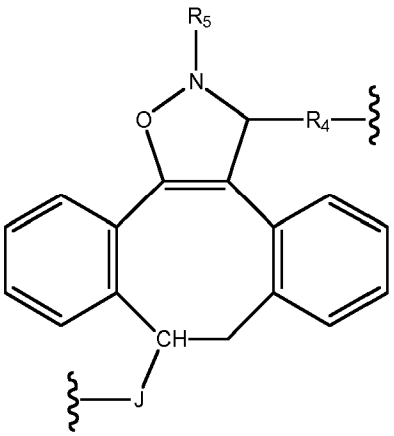
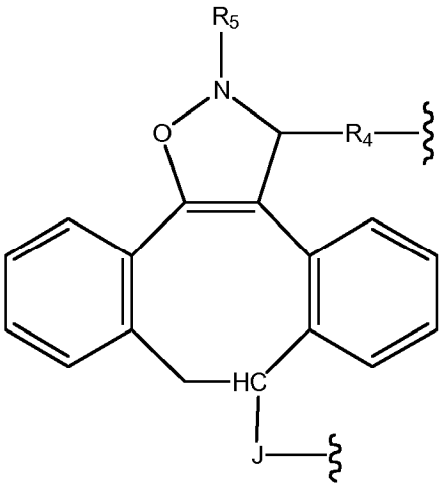
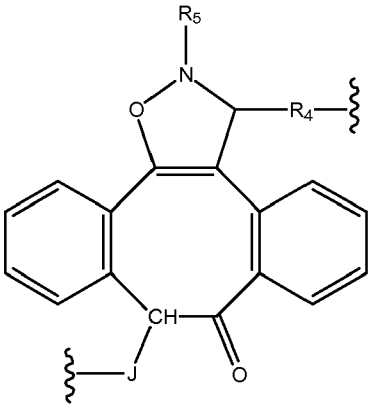
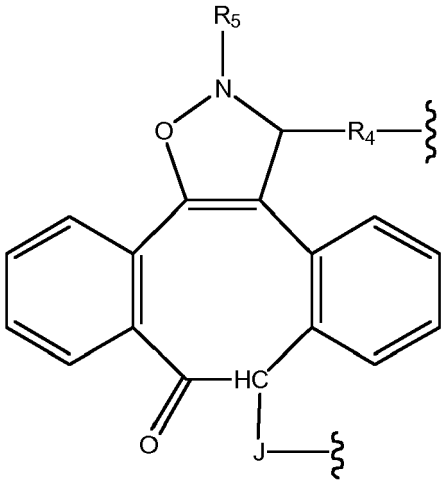
;



;

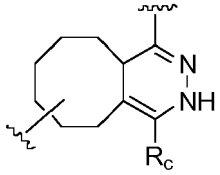


;

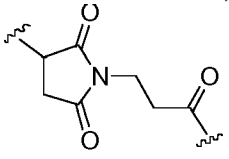
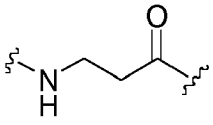
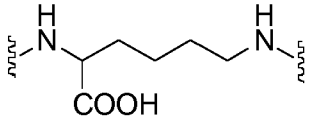
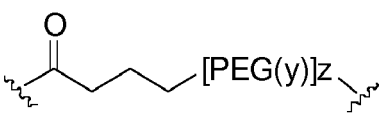
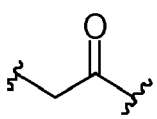
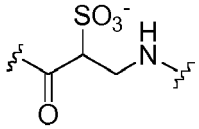
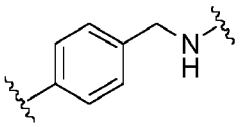





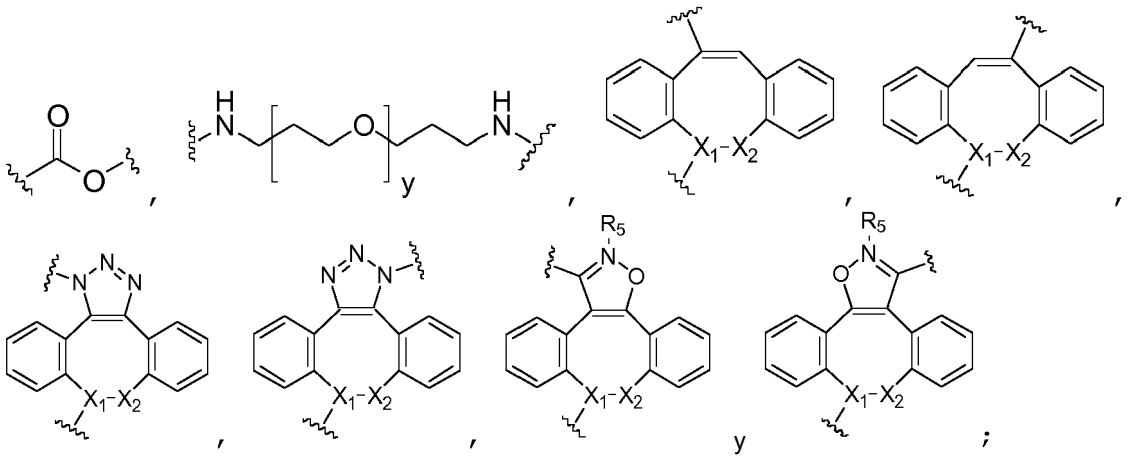
que está opcionalmente sustituida en cualquier posición,

en la que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en la que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a



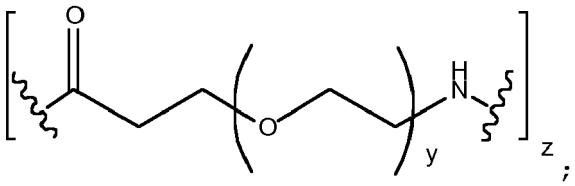
una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



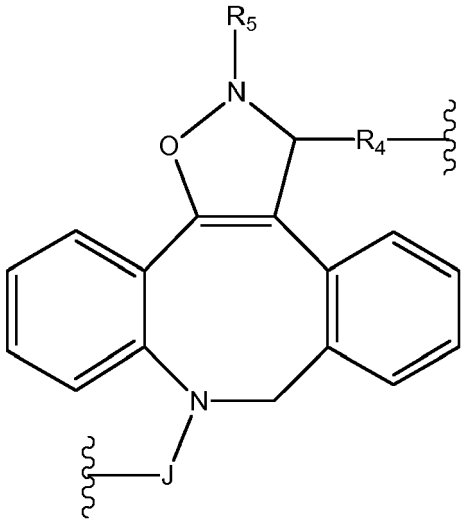
en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en la que [PEG(y)]z es:



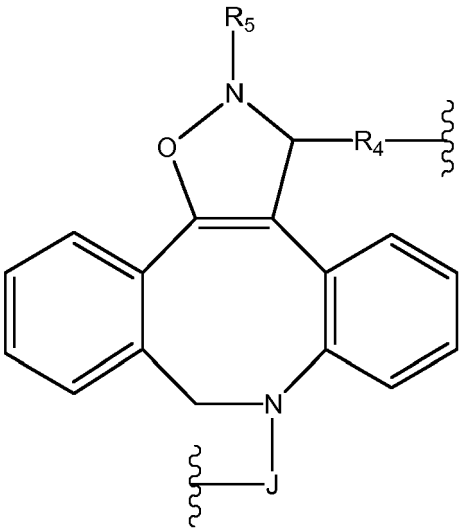
en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

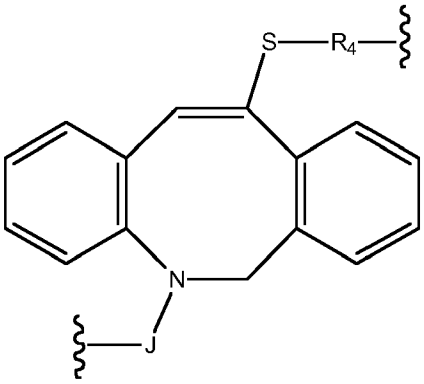
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



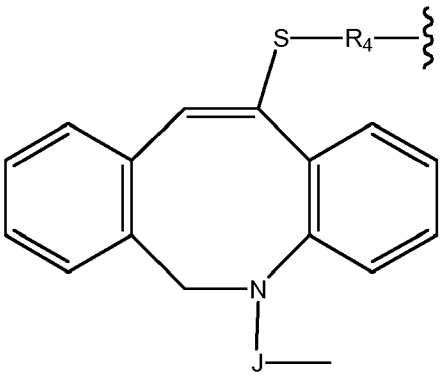
,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

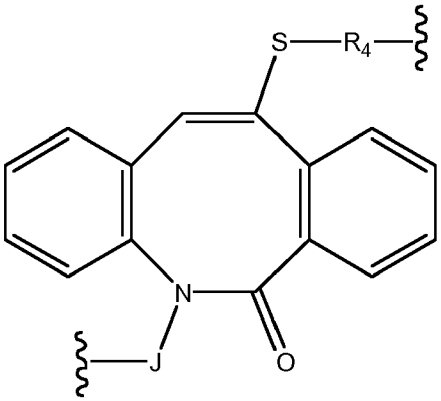
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



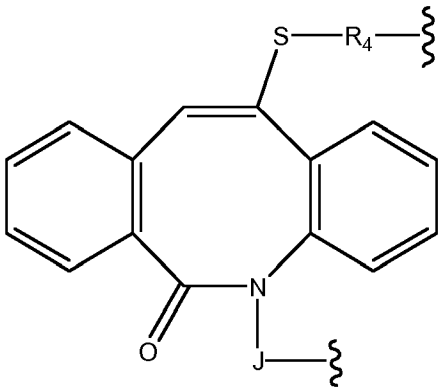
;



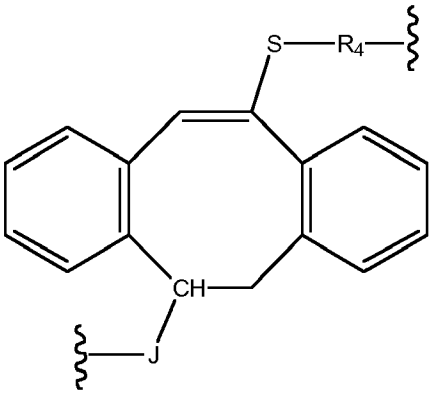
;



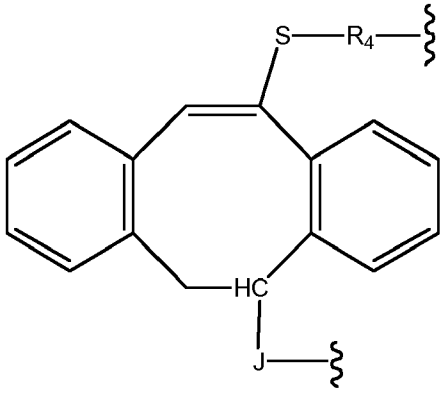
;



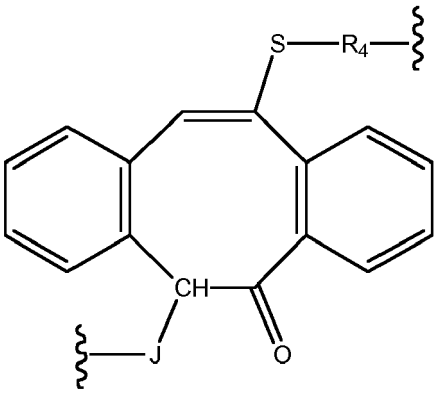
;



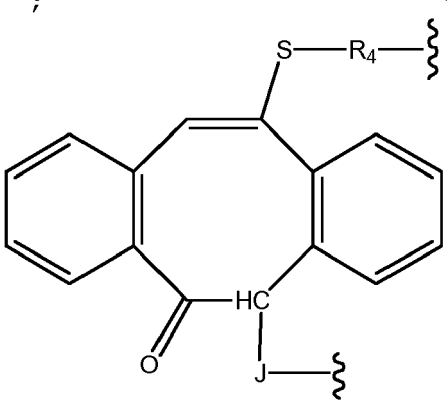
;



;



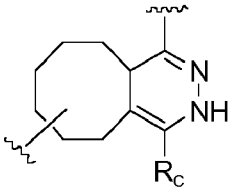
o



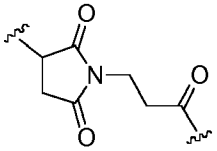
,

que está opcionalmente sustituida en cualquier posición,

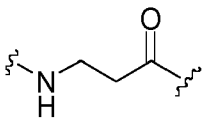
en la que J es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en la que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a



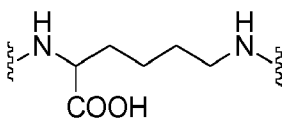
una isoxazolidina, un dibenzocicloocteno, un dibenzoazacicloocteno,



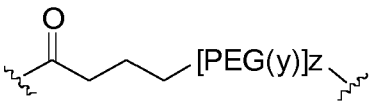
,



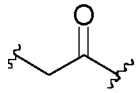
,



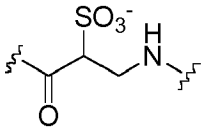
,



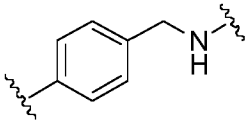
,



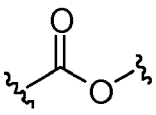
,



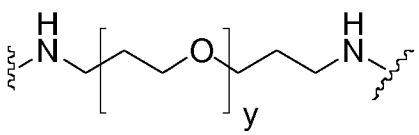
,



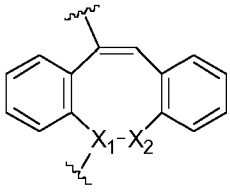
,



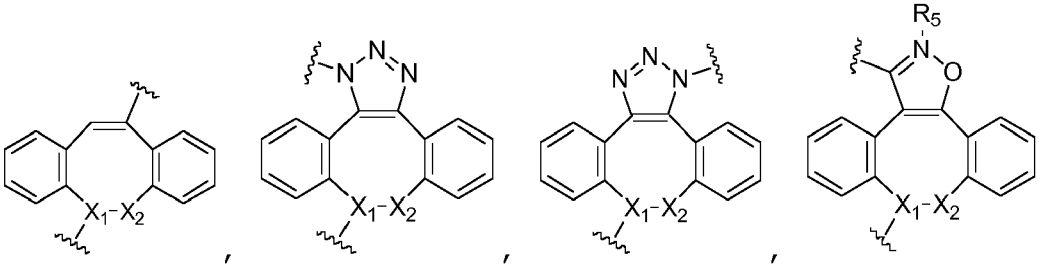
,



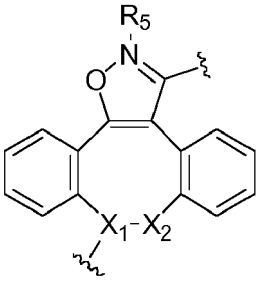
,



,



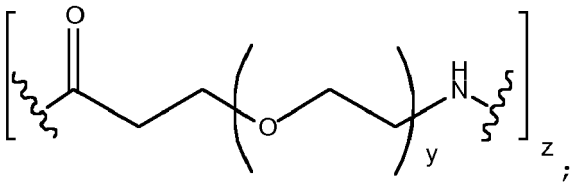
y



;

en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

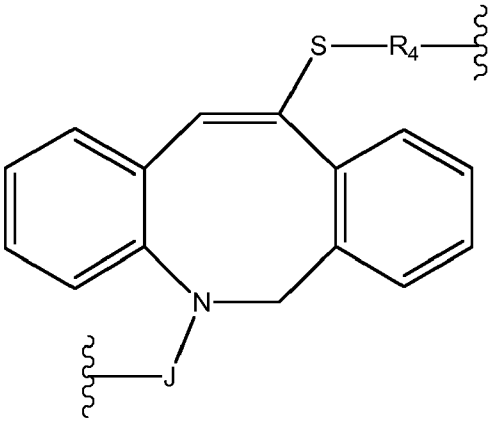
en la que [PEG(y)]z es:



;

en el que y = 1-100 y z = 1-10.

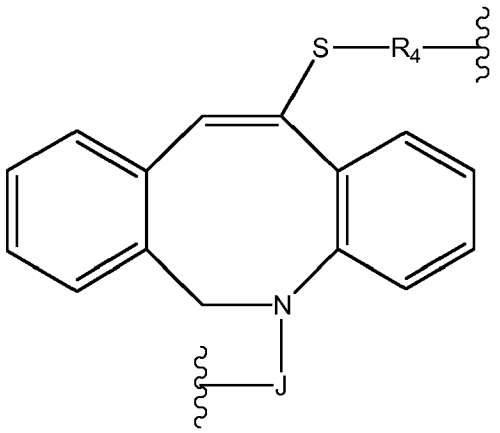
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



,

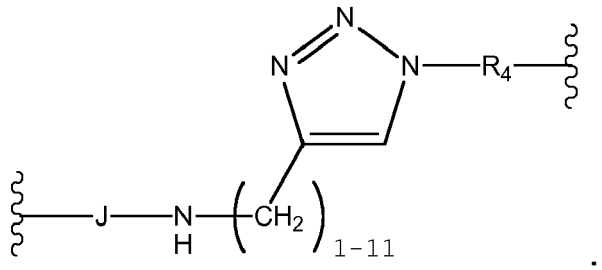
que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



que está opcionalmente sustituida en cualquier posición.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



En algunos aspectos, R_1 es H.

En algunos aspectos, en los que J es una estructura orgánica que comprende un grupo [PEG(y)]z.

En algunos aspectos, en los que J es una estructura orgánica que comprende un grupo polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico) o polisacárido.

En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende un grupo alquilo C_1-C_4.

En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende una succinimida.

En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende amina.

En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende un succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo o adipoílo.

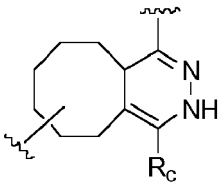
En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende un malonilo.

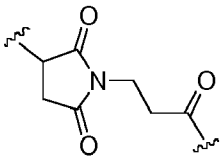
En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende un aminoácido.

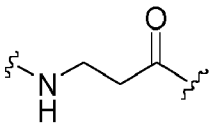
En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende una cisteína.

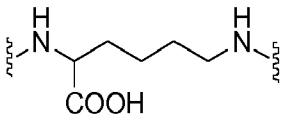
En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que comprende una lisina.

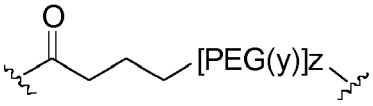
En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que consiste en una cadena de 3 restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctenо, un dibenzoazaciclooctenо,

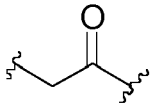


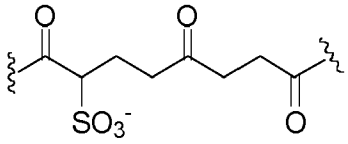
,


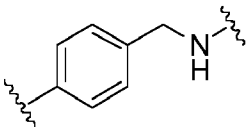
,


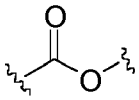
,


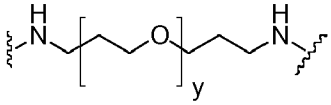
,


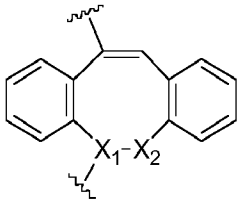
,


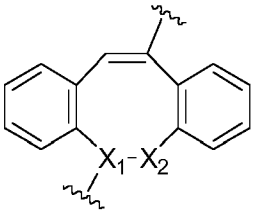
,


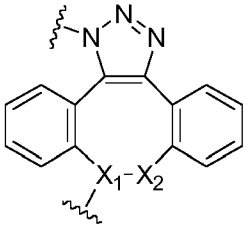
,


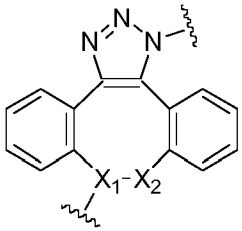
,


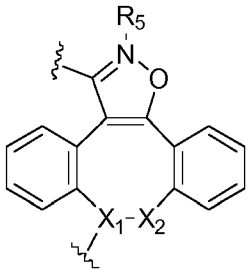
,


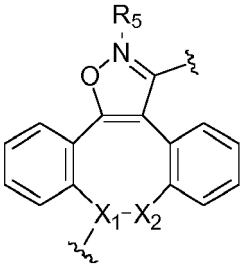
,


,


,


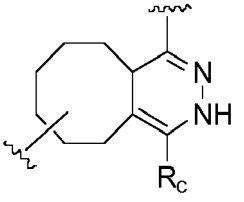
,


,


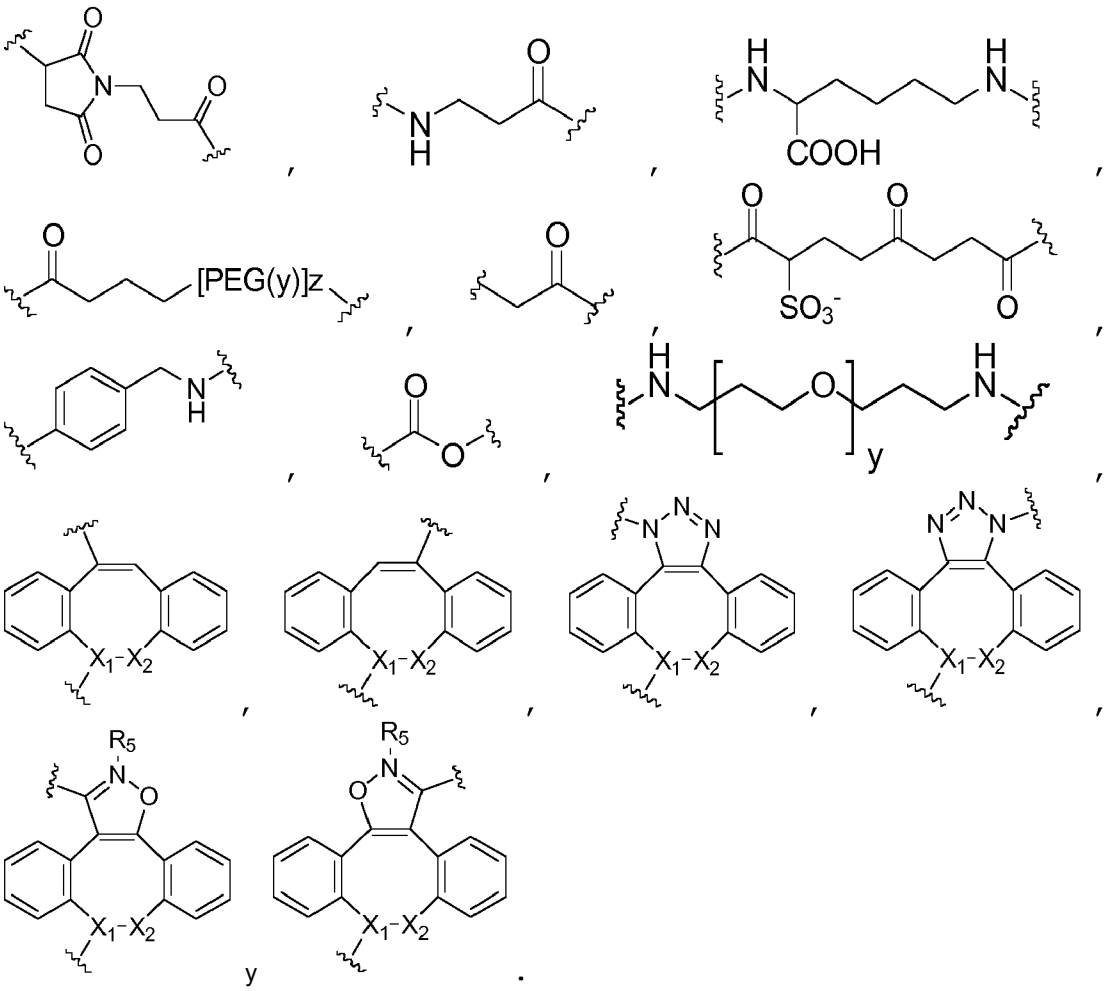
y


.

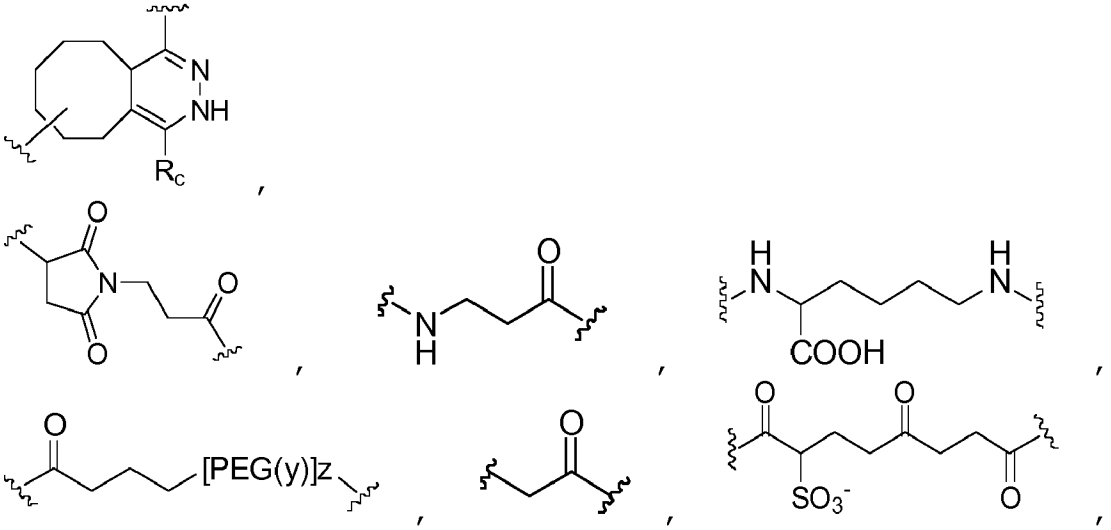
En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que consiste en una cadena de cuatro restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

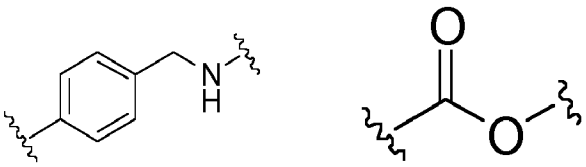
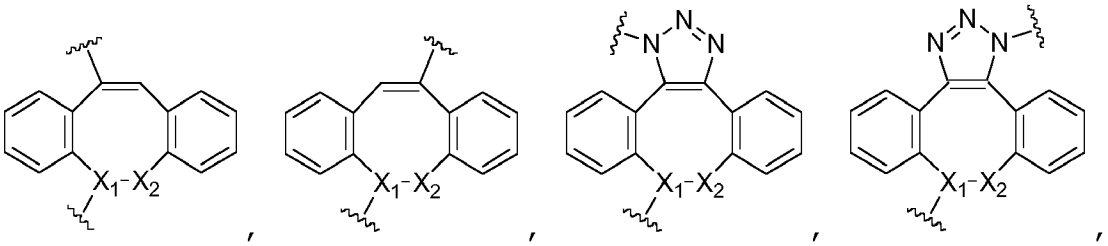
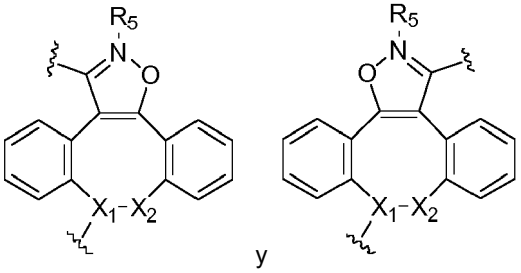


,



En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que consiste en una cadena de cinco restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazacicloocteno,



y .

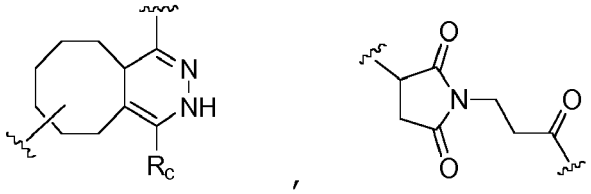
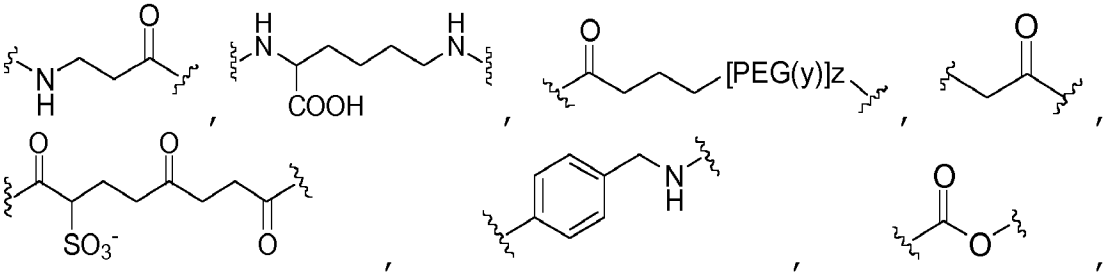
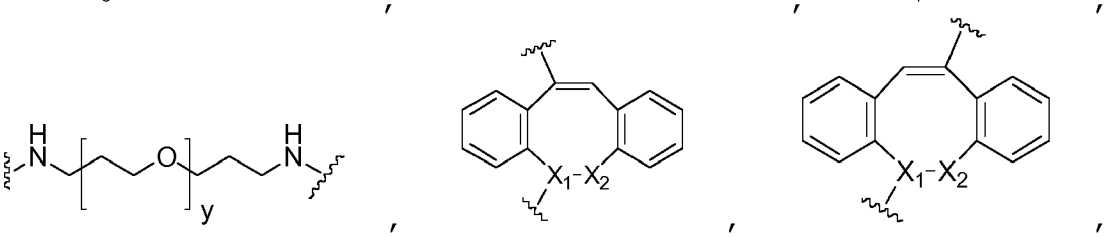
En algunos aspectos, J comprende un grupo [PEG(y)]z unido a una lisina.

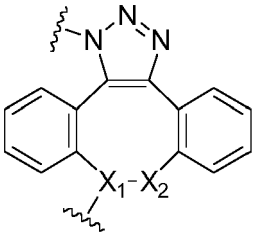
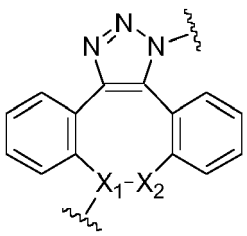
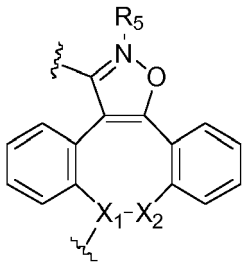
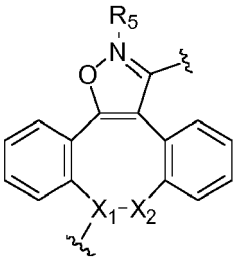
En algunos aspectos, J comprende un grupo acilo C_1-C_4 unido a un grupo succinimida.

En algunos aspectos, J comprende una lisina unida a un acilo C_1-C_4.

En algunos aspectos, J comprende un grupo [PEG(y)]z, que está unido a un glutarilo.

En algunos aspectos, J es una estructura orgánica que consiste en una cadena de cinco restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, acilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, un aminoácido, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

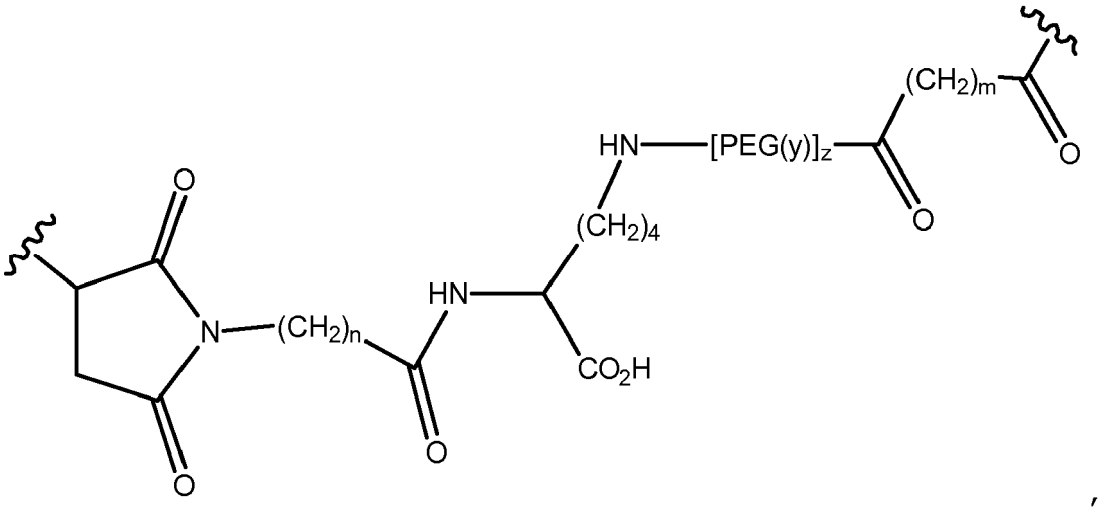





,

,

y

.

En algunos aspectos, J es un enlace.

En algunos aspectos, J es una cisteína.

En algunos aspectos, J tiene la estructura:

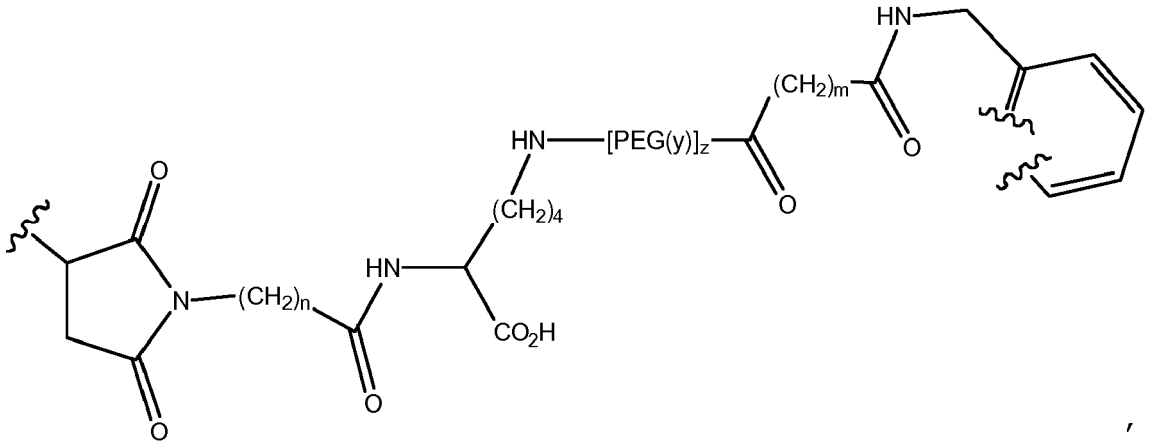

,

en la que n 1-3, m es 1-4 y es 1-100 y z es 1-10.

En algunos aspectos, J tiene una estructura lineal.

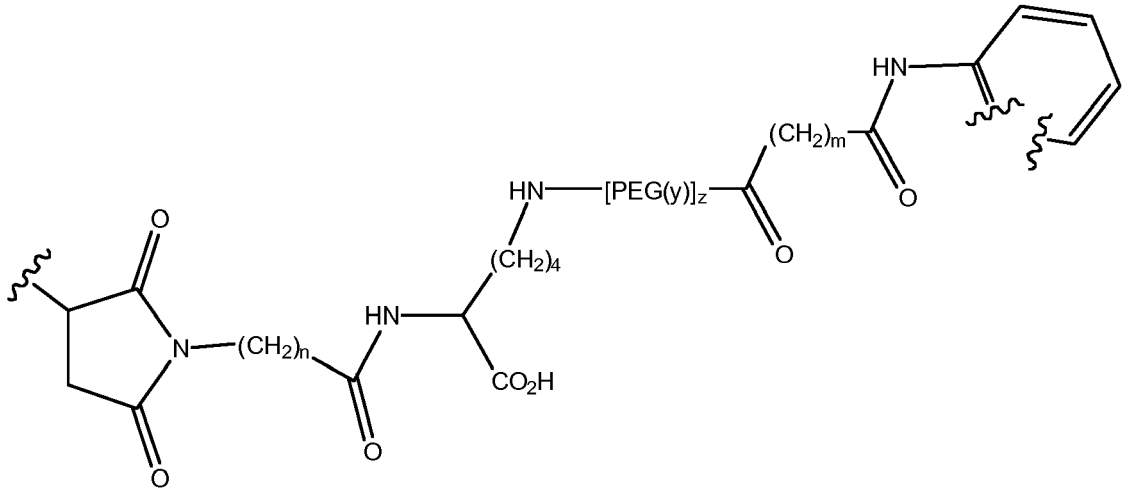
En algunos aspectos, J tiene una estructura ramificada.

En algunos aspectos, R_2 es



,

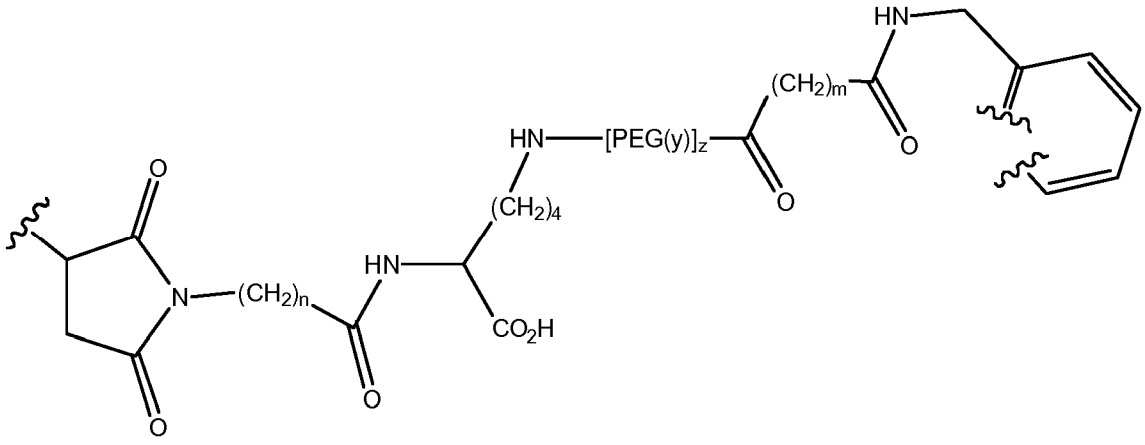
o



,

en los que n 1-3, m es 1-4, y es 1-100 y z es 1-10.

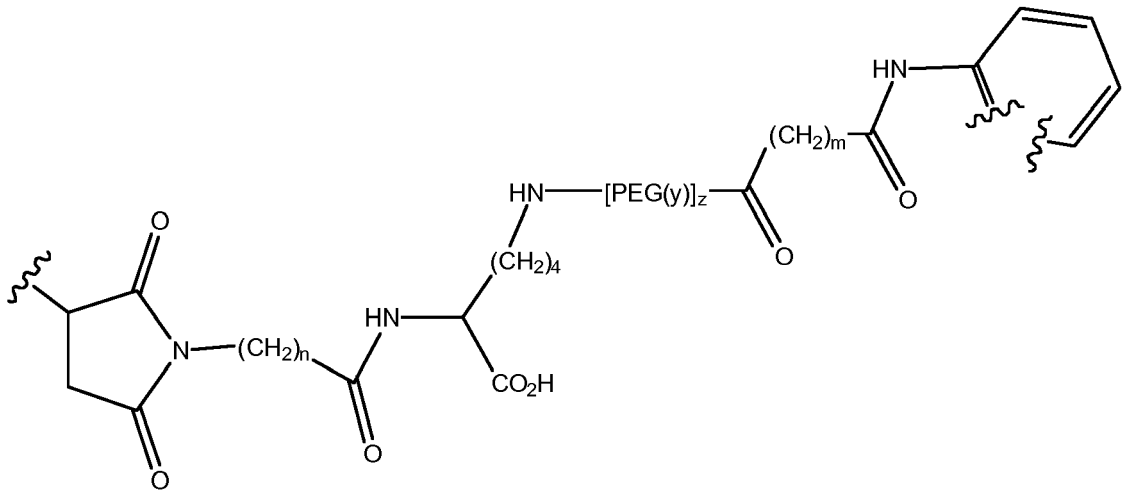
En algunos aspectos, R_2 es



,

en el que n 1-3, m es 1-4, y es 1-100 y z es 1-10.

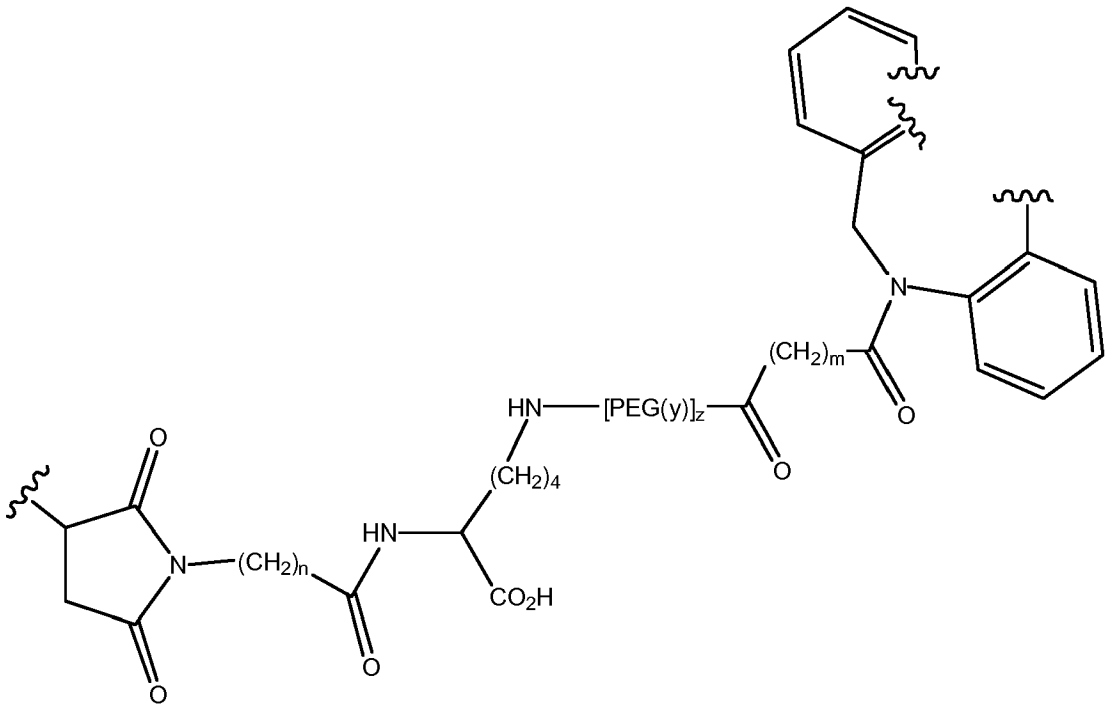
En algunos aspectos, R_2 es



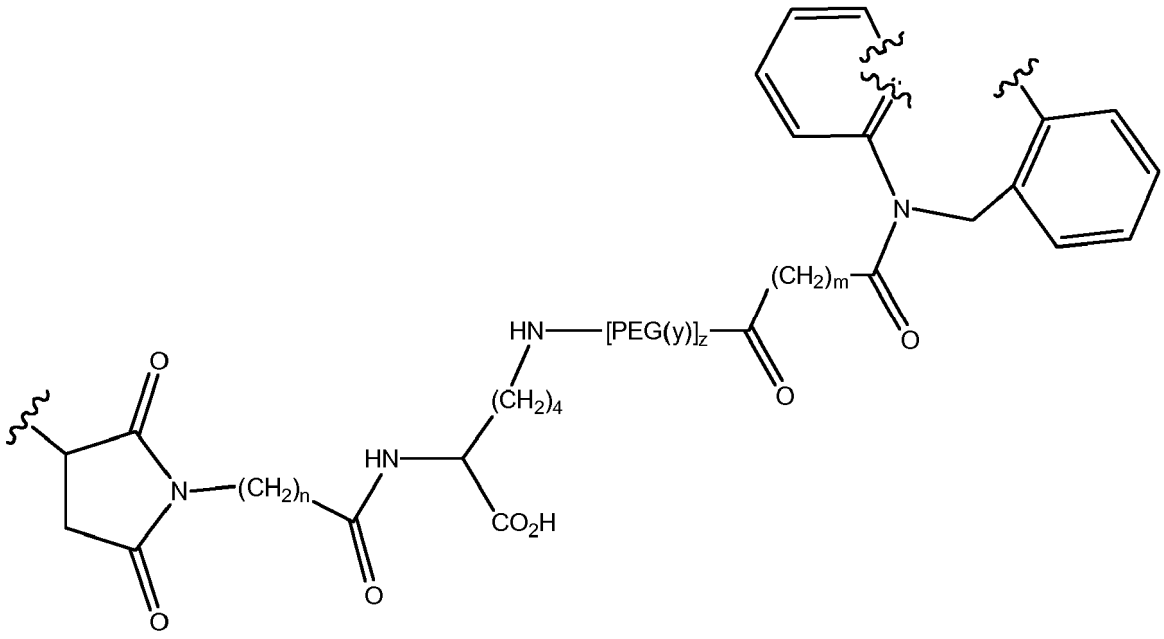
,

en el que n 1-3, m es 1-4, y es 1-100 y z es 1-10.

En algunos aspectos, R_1 y R_2 tomados juntos son:

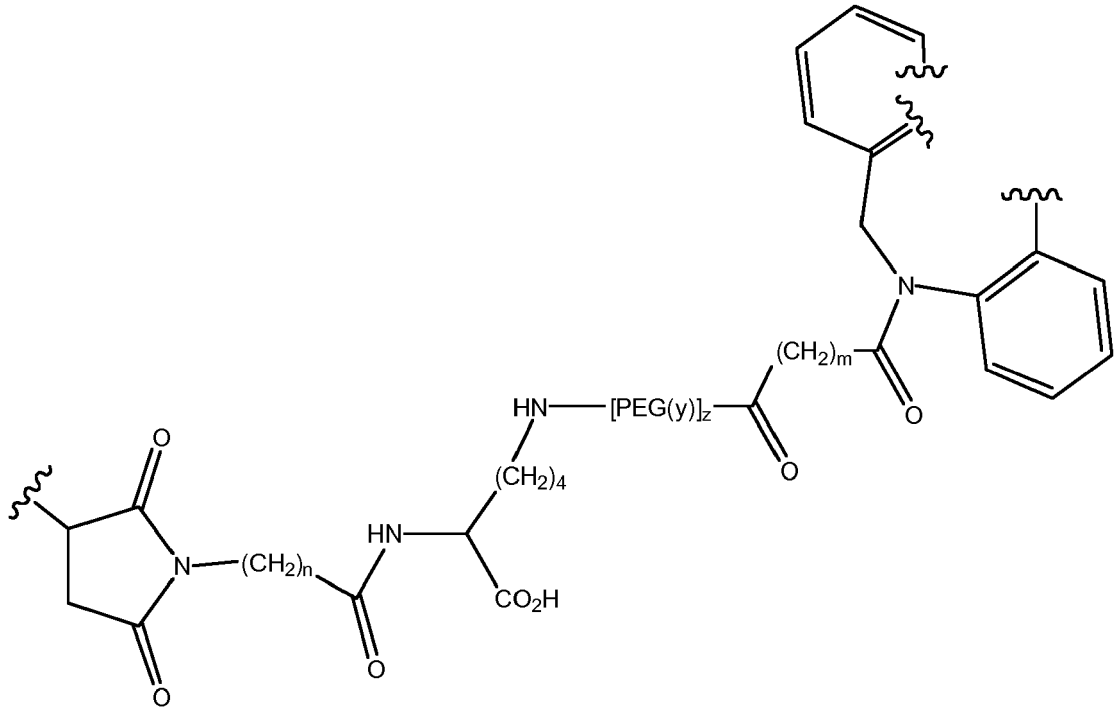


o



en los que n 1-3, m es 1-4, y es 1-100 y z es 1-10.

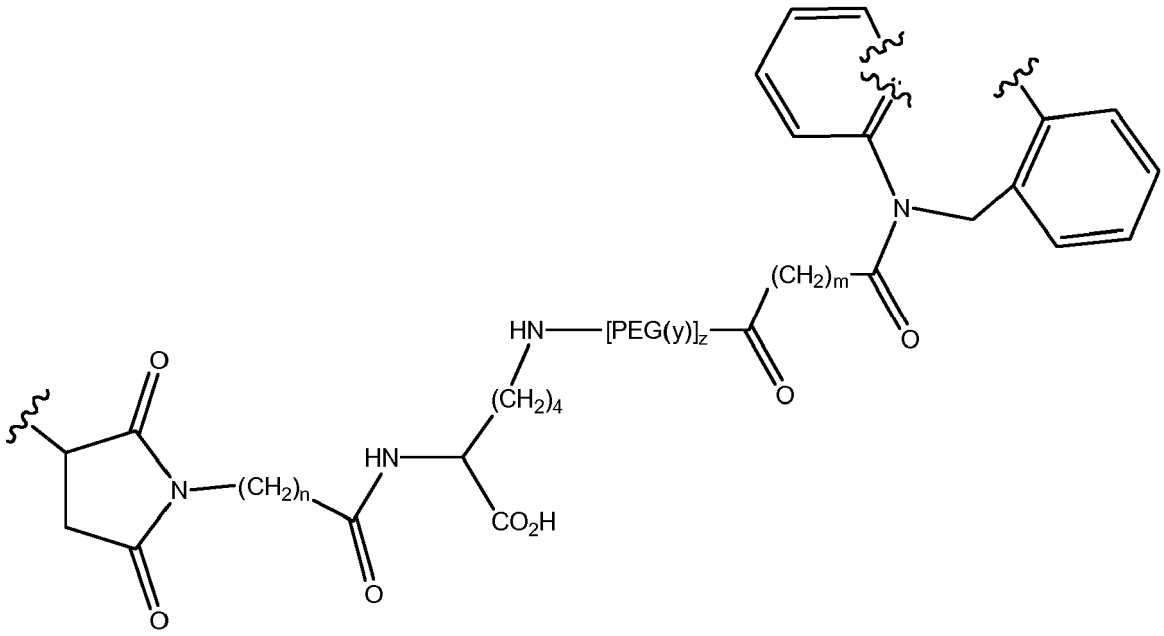
En algunos aspectos, R_1 y R_2 tomados juntos son:



,

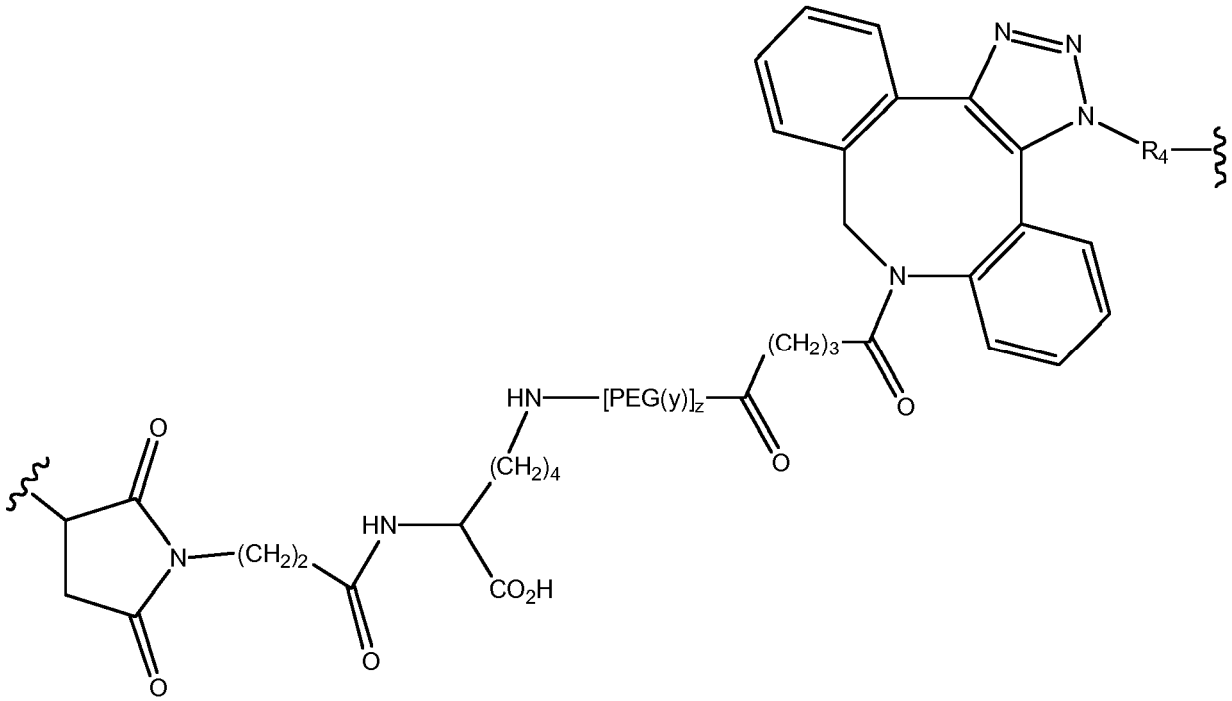
en el que n 1-3, m es 1-4, y es 1-100 y z es 1-10.

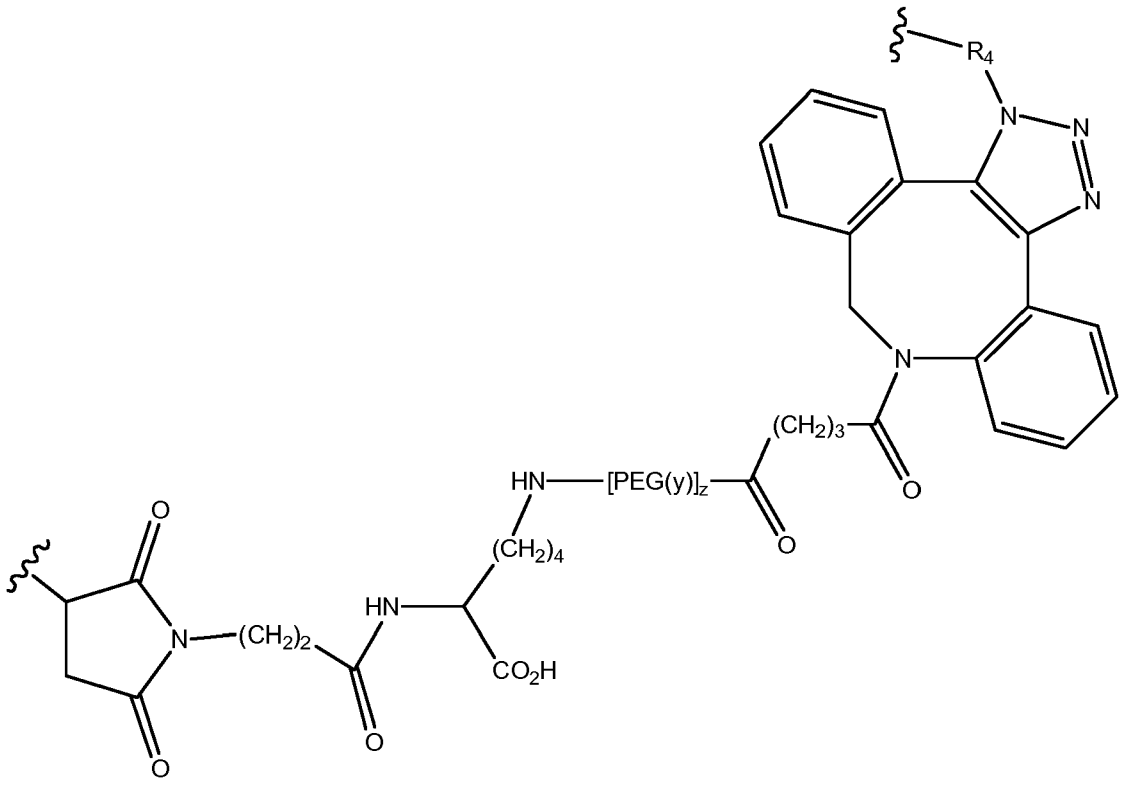
En algunos aspectos, R_1 y R_2 tomados juntos son:



en el que n 1-3, m es 1-4, y es 1-100 y z es 1-10.

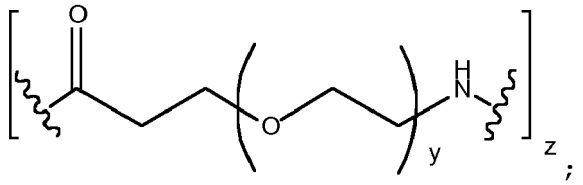
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:





o ,

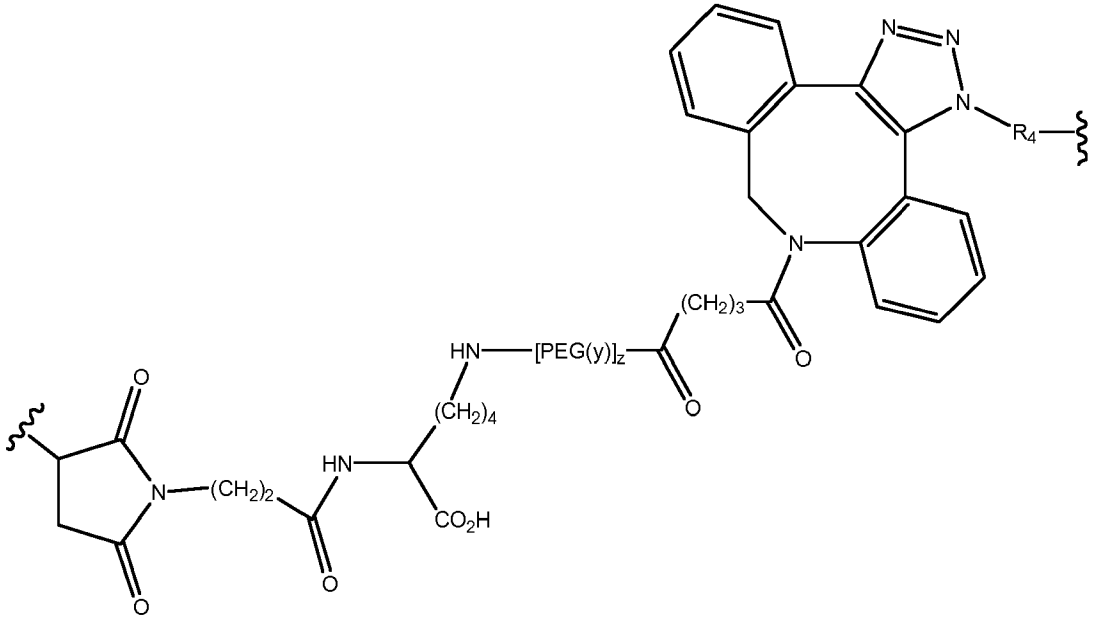
en la que [PEG(y)]z es:



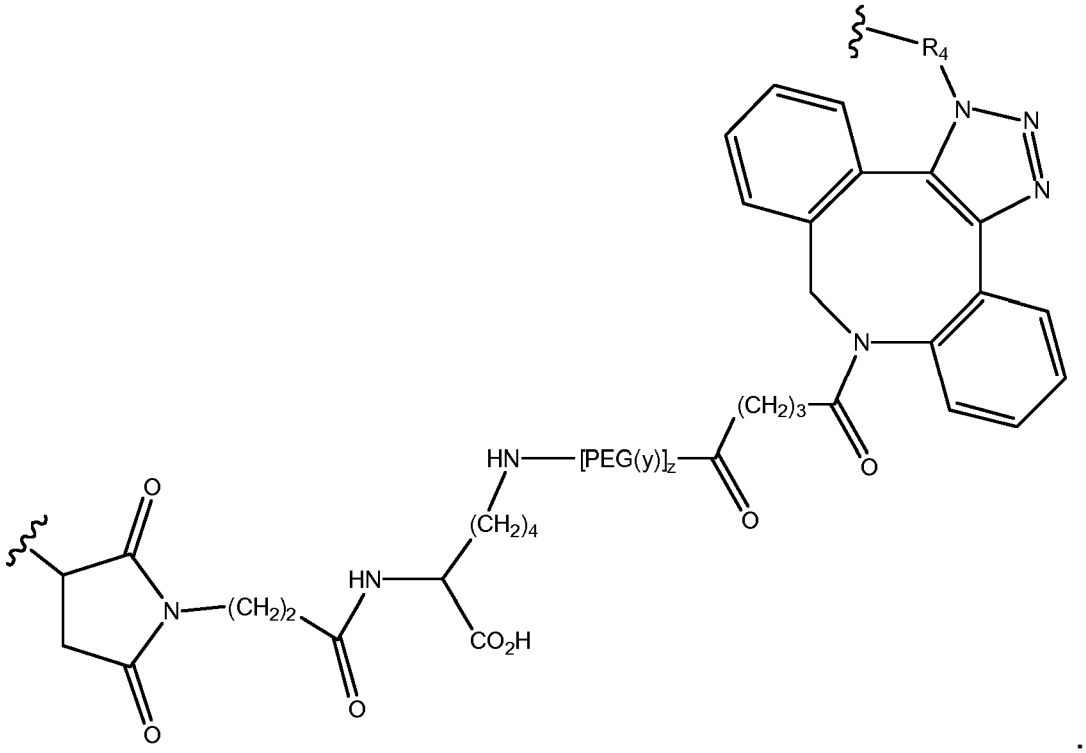
;

en el que y = 1-100 y z = 1-10.

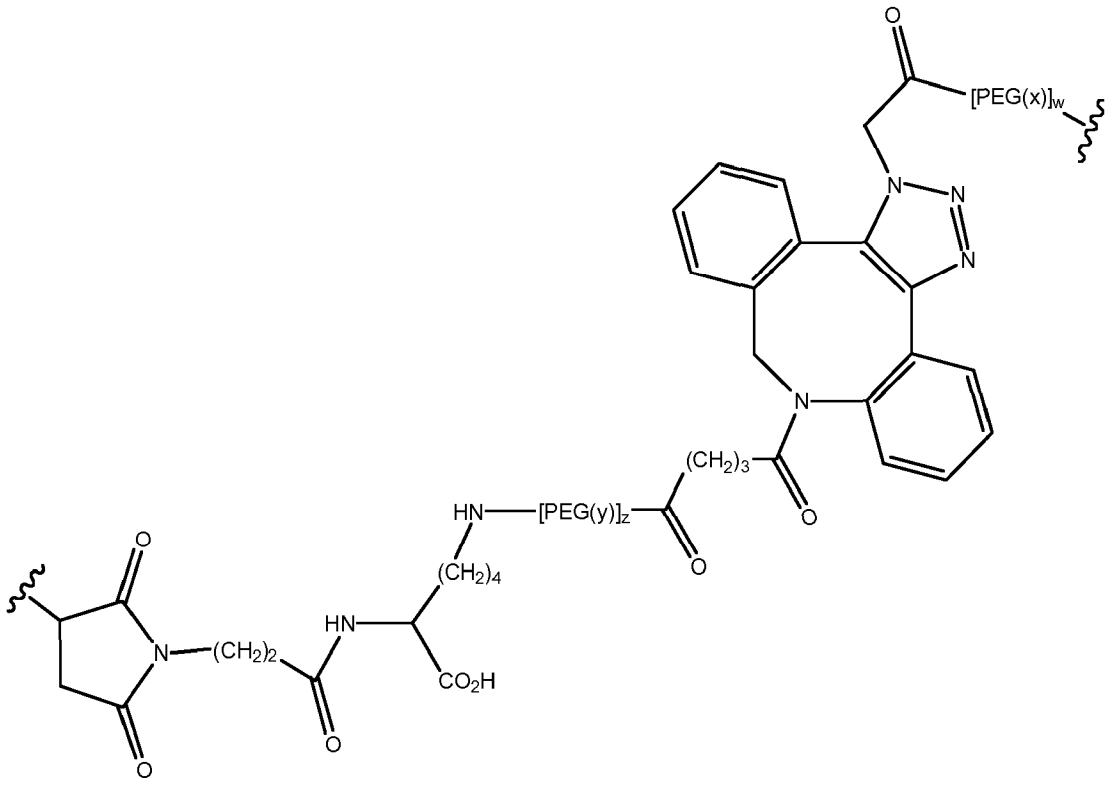
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:

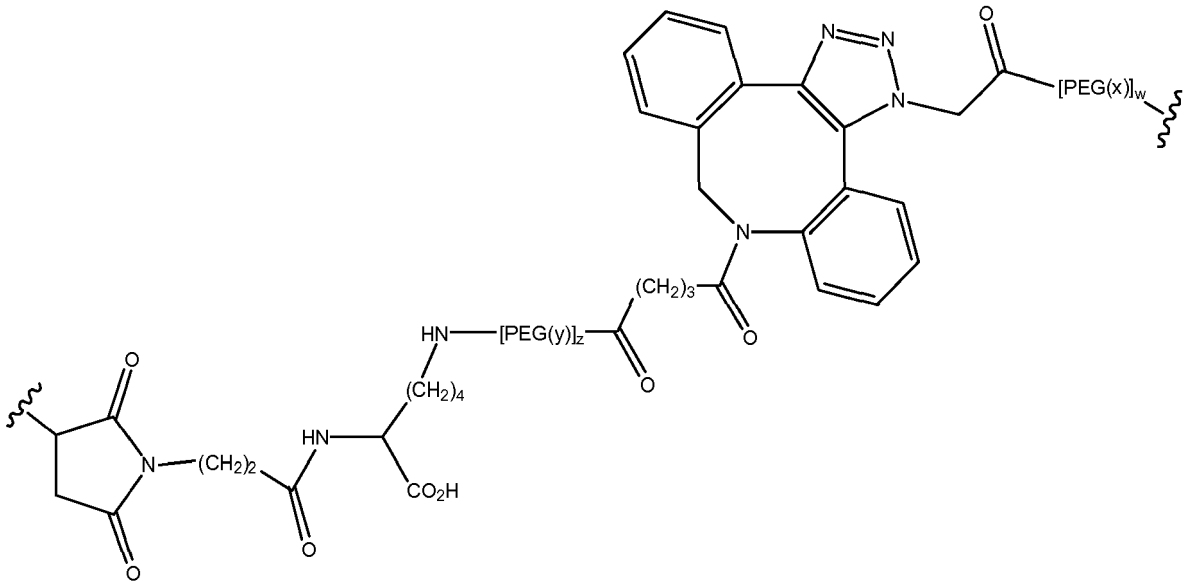


En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



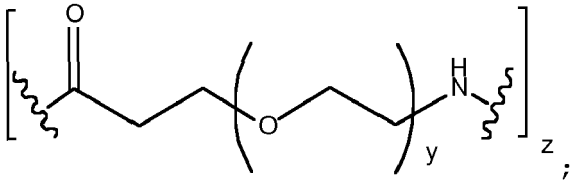
,

o



;

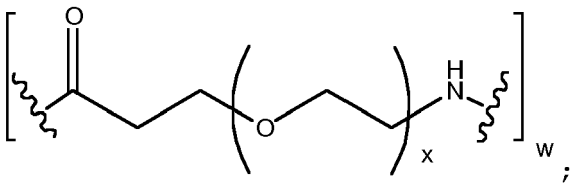
en la que [PEG(y)]z es:



;

en el que y = 1-100 y z = 1-10;

en la que [PEG(x)]w es:

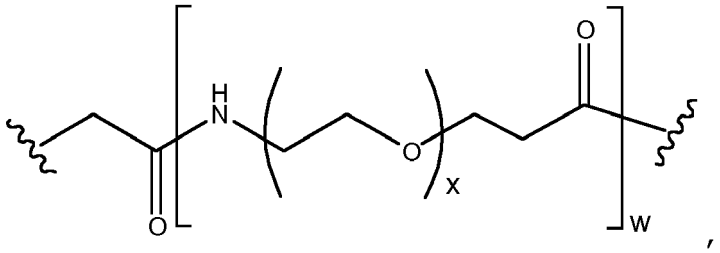


en el que x = 1-100 y w = 1-10.

En algunos aspectos, y es 1-20. En algunos aspectos, y es 21-40. En algunos aspectos, y es 41-60. En algunos aspectos, y es 61-80. En algunos aspectos, y es 30-50. En algunos aspectos, y es 12, 24, 36 o 48. En algunos aspectos, z es 1. En algunas realizaciones, z es 0.

En algunos aspectos, el carbonilo terminal del grupo [PEG(y)]z forma parte de un enlace amida.

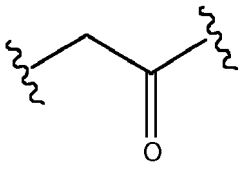
En algunos aspectos, la amina terminal del grupo [PEG(y)]z forma parte de un enlace amida.

En algunos aspectos, R_4 es 

en el que x es 1-100 y w es 0-5.

En algunos aspectos, x es 1-20. En algunos aspectos, x es 21-40. En algunos aspectos, x es 41-60. En algunos aspectos, x es 61-80. En algunos aspectos, x es 30-50. En algunos aspectos, x es 12, 24, 36 o 48.

En algunos aspectos, w es 1. En algunos aspectos, w es 0.

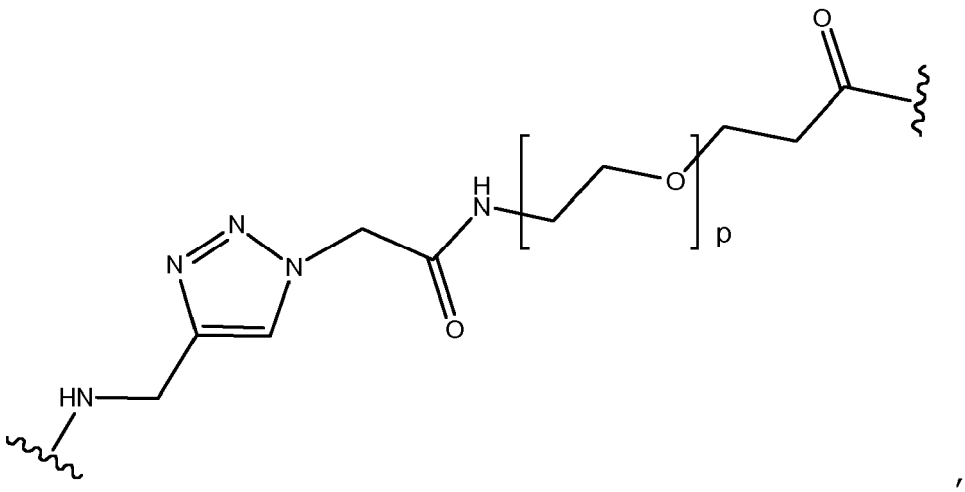
En algunos aspectos, R_4 tiene la estructura: 

En algunos aspectos, R_2 está unido a A mediante J, y R_4 está unido a B.

En algunos aspectos, R_2 está unido a B mediante J, y R_4 está unido a.

En algunos aspectos, R_4 está unido a B mediante el carbono de carbonilo terminal.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



en la que p = 0-5, 0-10, 0-50 o 0-100.

En algunos aspectos, donde R_2 está unido a A mediante un enlace carbono-nitrógeno o un enlace carbono-azufre.

En algunos aspectos, R_2 está unido a A mediante un enlace carbono-nitrógeno.

En algunos aspectos, el enlace carbono-nitrógeno es un enlace amida.

En algunos aspectos, R_2 está unido a A mediante un enlace biológicamente lábil.

En algunos aspectos, R_2 está unido a A mediante un enlace amida entre el aminoácido C-terminal de A y un grupo amino en B.

En algunos aspectos, el aminoácido terminal es cisteína.

En algunos aspectos, R_2 está unido a A mediante un enlace carbono-azufre.

En algunos aspectos, R_2 está unido a A mediante un enlace carbono-azufre formado entre R_2 y un tiol libre.

En algunos aspectos, R_2 está unido a A mediante un enlace succinimida-azufre.

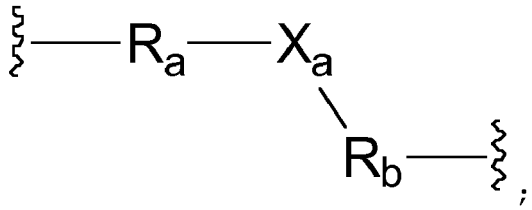
En algunos aspectos, J comprende un residuo ramificado.

En algunos aspectos, J está unido a más de un A mediante el residuo ramificado.

En algunos aspectos, B comprende un residuo ramificado.

En algunos aspectos, B está unido a más de un A, cada uno mediante una unión distinta de peptidilo con el residuo ramificado.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:

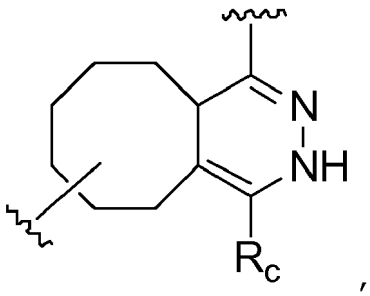


;

en la que X_a es una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina; y

en la que R_a representa una estructura orgánica que se conecta a uno de A o B y R_b representa una estructura orgánica que se conecta al otro de A o B.

En algunos aspectos, X_a tiene la estructura:

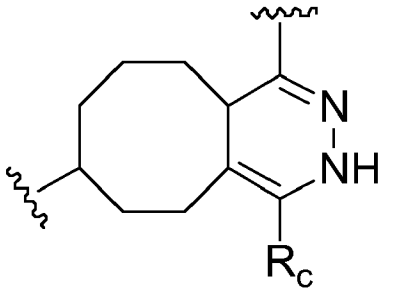


,

en la que R_c es H, alquilo o arilo;

o un tautómero de la misma.

En algunos aspectos, X_a tiene la estructura:

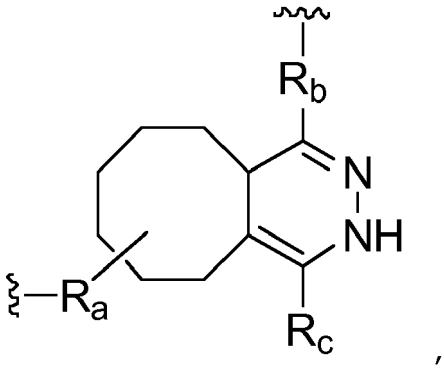


en la que R_c es H, alquilo o arilo;

o un tautómero de la misma.

En algunos aspectos, R_a está conectado al ciclooctano y R_b está conectado a la dihidropiridazina.

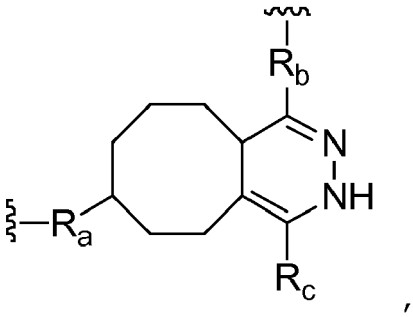
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



en la que R_c es H, alquilo o arilo;

o un tautómero de la misma.

En algunos aspectos, X_a tiene la estructura:

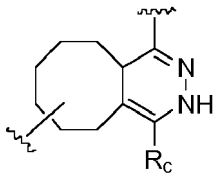


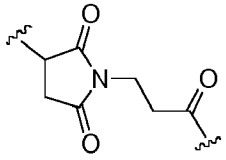
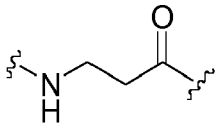
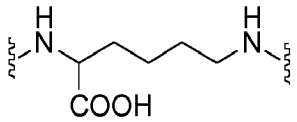
en la que R_c es H, alquilo o arilo;

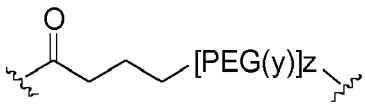
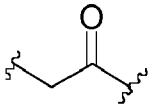
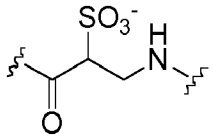
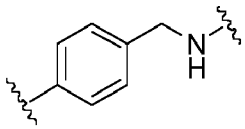
o un tautómero de la misma.

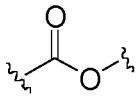
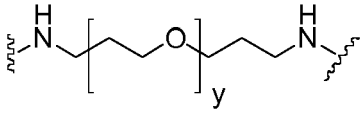
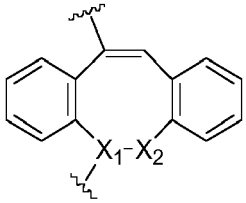
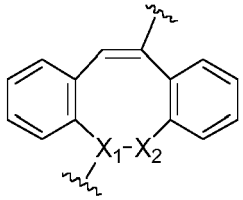
En algunos aspectos, R_c es metilo.

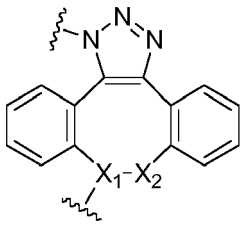
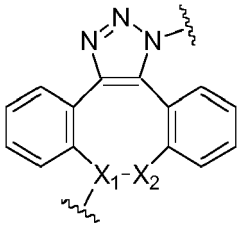
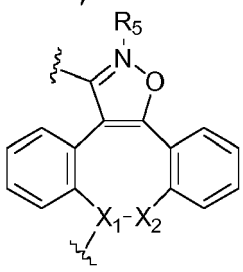
En algunos aspectos, R_a y R_b son independientemente un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctenо, un

dibenzoazaciclooctenо,  ,

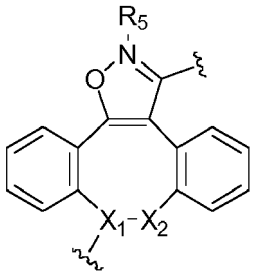
 ,  ,  ,

 ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,  ,

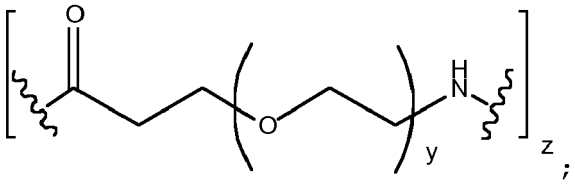
 ,  ,  ,

y

 ;

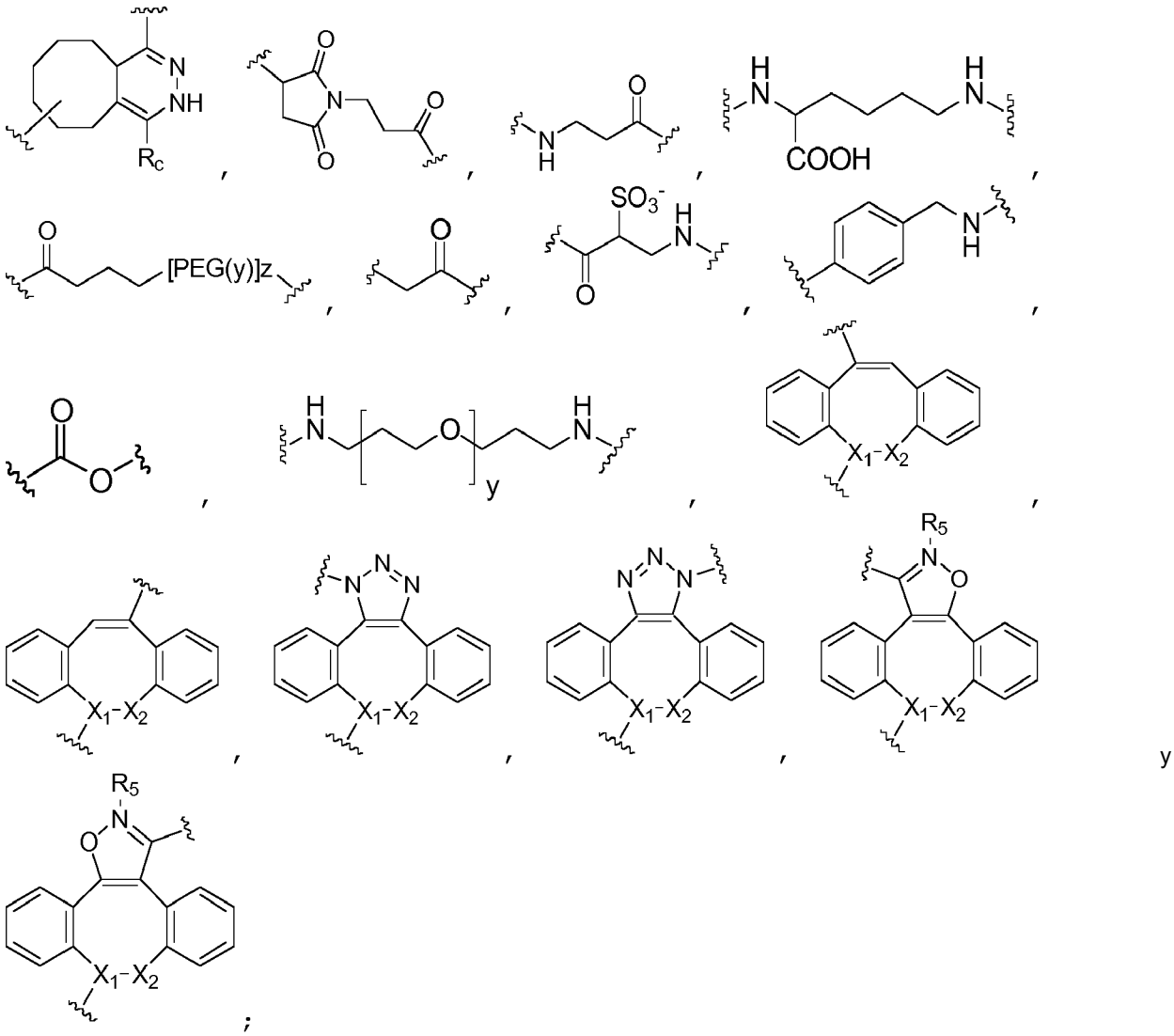
en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en la que [PEG(y)]z es:

 ;

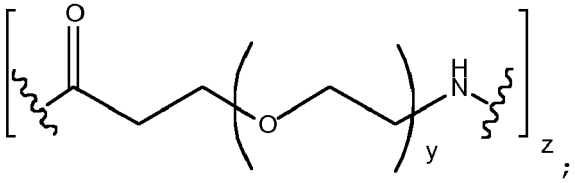
en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunos aspectos, R_a y R_b son independientemente un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, acilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, un aminoácido, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en el que [PEG(y)]z es:



en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunos aspectos, R_a o R_b está unido a A mediante un enlace carbono-nitrógeno o un enlace carbono-azufre.

En algunos aspectos, R_a o R_b está unido a A mediante un enlace carbono-nitrógeno.

En algunos aspectos, el enlace carbono-nitrógeno es un enlace amida.

En algunos aspectos, R_a o R_b está unido a A mediante un enlace biológicamente lábil.

En algunos aspectos, R_a o R_b está unido a A mediante un enlace amida entre el aminoácido C-terminal de A y un grupo amino en B.

En algunos aspectos, el aminoácido terminal es cisteína.

En algunos aspectos, R_a o R_b está unido a A mediante un enlace carbono-azufre.

En algunos aspectos, R_a o R_b está unido a A mediante un enlace carbono-azufre formado entre R_a o R_b y un tiol libre.

En algunos aspectos, en los que R_a o R_b está unido a A mediante un enlace succinimida-azufre.

En algunos aspectos, R_a o R_b comprende un residuo ramificado.

En algunos aspectos, R_a o R_b está unido a más de un A mediante el residuo ramificado.

En algunos aspectos, la actividad biológica de A se aumenta cuando forma parte de un compuesto o dímero de la invención en comparación con la actividad biológica de A cuando no está unido a ninguna otra estructura.

En algunos aspectos, A comprende la estructura de un compuesto que es un fármaco aprobado para tratar a un sujeto que padece una enfermedad.

En algunos aspectos, el sujeto es un sujeto mamífero.

En algunos aspectos, el sujeto mamífero es un sujeto humano.

En algunos aspectos, A comprende la estructura de un compuesto orgánico que tiene un peso molecular de menos de 1000 Dalton, un aptámero de ADN, un aptámero de ARN, un oligonucleótido o una proteína que es biológicamente activa.

En algunos aspectos, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido.

En algunos aspectos, el oligonucleótido es una molécula de inducción de interferencia de ARN.

En algunos aspectos, el oligonucleótido codifica para una molécula de inducción de interferencia de ARN.

En algunos aspectos, A comprende una amina primaria o una secundaria.

En algunos aspectos, A está unido a B mediante la amina primaria o secundaria.

En algunos aspectos, A comprende una amina primaria.

En algunos aspectos, A es aripiprazol u oseltamivir.

En algunos aspectos, A comprende una amina secundaria.

En algunos aspectos, A es un fármaco respiratorio, un agente antihistamínico, un agente analgésico, un antidepresivo, un agente antianginoso, un agente antiarrítmico, un agente antihipertensor, un agente antidiabético, un antihistamínico, un agente antiinfeccioso, un antibiótico, un agente antiinflamatorio, un fármaco antiparkinsoniano, un antipsicótico, un agente antipirético, un agente antiulceroso, un fármaco contra trastorno por déficit de atención con hiperactividad (ADHD), un estimulante del sistema nervioso central, un descongestionante o un psicoestimulante.

En algunos aspectos, A es alprenolol, acebutolol, amidefrina, amineptina, amosulalol, amoxapina, anfetaminilo, atenolol, atomoxetina, balofloxacino, bametán, befunolol, benazepril, benfluorex, benzoctamina, betahistina, betaxolol, bevantolol, bifemelano, bisoprolol, brinzolamida, bufeniodo, butetamina, camilofina, carazolol, carticaína, carvedilol, cefaelina, ciprofloxacino, clozapina, clobenzorex, clorprenalina, ciclopentamina, delapril, demexiptilina, denopamina, desipramina, desloratadina, diclofenaco, dimetofrina, dioxadrol, dobutamina, dopexamina, doripenem, dorzolamida, droprenilamina, duloxetina, eltoprazina, enalapril, enoxacino, epinefrina, ertapenem, esaprazol, esmolol, etoxadrol, fasudil, fendilina, fenetilina, fenfluramina, fenoldopam, fenoterol, fenproporex, flecamida, fluoxetina, formoterol, frovatriptan, gaboxadol, garenoxacino, gatifloxacino, grepafloxacino, hexoprenalina, imidapril, indalpina, indecainida, clorhidrato de indeloxazina, isoxsuprina, isproniclina, labetalol, landiolol, lapatinib, levofacetoperano, lisinopril, lomefloxacino, lotrafibán, maprotilina, mecamilamina, mefloquina, mepindolol, meropenem, metapramina, metaproterenol, metoxifenamina, metilfenidato dextrógiro, metilfenidato, metipranolol, metoprolol, mitoxantrona, mivazerol, moexipril, moprolol, moxifloxacino, nebivolol, nifenalol, nipradilol, norfloxacino, nortriptilina, nilidrina, olanzapina, oxamniquina, oxprenolol, oxifedrina, paroxetina, perhexilina, fenmetrazina, fenilefrina, fenilpropilmetilamina, foledrina, picilorex, pimetilina, pindolol, ácido pipemídico, piridocaína, practolol, pradofloxacino, pramipexol, pramiverina, prenalterol, prenilamina, prilocaína, procaterol, pronetalol, propafenona, propranolol, propilhexedrina, protoquilol, protriptilina, pseudoefedrina, reboxetina, rasagilina, (r)-rasagilina, repinotano, reproterol, rimiterol, ritodrina, safinamida, salbutamol/albuterol, salmeterol, sarizotano, sertralina, silodosina, sotalol, soterenol, esparfloxacino, espirapril, sulfinalol, sinefrina, tamsulosina, tebaniclina, tianeptina, tirofibán, tretoquinol, trimetazidina, troxipida, vareniclina, vildagliptina, viloxazina, viquidil o xamoterol.

En algunos aspectos, A comprende una proteína que es biológicamente activa.

En algunos aspectos, A comprende una proteína secretada.

En algunos aspectos, A comprende un dominio extracelular de una proteína.

En algunos aspectos, A es biológicamente activo de tal manera que tiene actividad de unión a diana.

En algunos aspectos, el A es una proteína que se pliega de manera independiente o una porción de la misma.

En algunos aspectos, A es una proteína glicosilada.

En algunos aspectos, A comprende enlaces disulfuro dentro de la cadena.

En algunos aspectos, A se une a una citocina.

En algunos aspectos, la citocina es TNFα.

En algunos aspectos, A comprende péptido natriurético auricular (ANP), calcitonina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), endotelina, exenatida, péptido gástrico inhibidor (GIP), péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), péptido similar a glucagón 2 (GLP-2), un análogo de GLP-1 o GLP-2, péptido intestinal vasoactivo de glucagón (GVIP), ghrelina, péptido YY o secretina o una porción de los mismos.

En algunos aspectos, A comprende un tramo de aminoácidos consecutivos en la secuencia HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG.

En algunos aspectos, A comprende al menos un tramo de aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena pesada de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

En algunos aspectos, A comprende al menos un al menos un tramo de aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena ligera de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

En algunos aspectos, A comprende al menos un Fab o Fab' de un anticuerpo, o una porción del al menos un Fab o Fab'.

En algunos aspectos, A comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 copias del Fab o Fab' o porción de los mismos.

En algunos aspectos, A comprende Fab-1 o Fab'1 o una porción de los mismos del anticuerpo.

En algunos aspectos, A comprende Fab-2 o Fab'2 o una porción de los mismos del anticuerpo.

En algunos aspectos, A comprende dos manos de Fab o Fab' del anticuerpo.

En algunos aspectos, el Fab o Fab' está presente en adalimumab

En algunos aspectos, A comprende al menos un tramo de aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en un anticuerpo de cadena sencilla.

En algunos aspectos, A comprende al menos un tramo de aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en un receptor de TNFα.

En algunos aspectos, el receptor de TNFα es TNR1B.

En algunos aspectos, un compuesto de la invención forma parte de un homodímero.

En algunos aspectos, un compuesto de la invención forma parte de un heterodímero.

La presente invención proporciona homodímeros que comprenden compuestos de la invención.

La presente invención proporciona heterodímeros que comprenden compuestos de la invención.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero puede unirse al otro mediante al menos un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero puede unirse al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el Z de cada compuesto.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero está unido al otro mediante al menos un enlace disulfuro.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero está unido al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el Z de cada compuesto.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero está unido de manera no covalente al otro.

La presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:



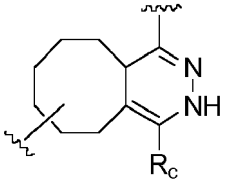
en la que Z es un componente de proteína del compuesto, componente de proteína que comprende uno o más polipéptidos, en el que al menos uno de los uno o más polipéptidos comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una cisteína o una selenocisteína;

en la que B es un residuo de ácido orgánico, o un tramo de 1-50 residuos de aminoácido que une R_a y Z;

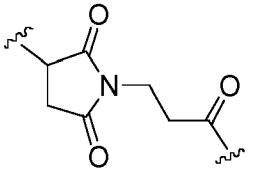
en la que la línea discontinua entre B y Z representa una unión peptidilo;

en la que L se selecciona del grupo que consiste en: una tetrazina y un trans-cicloocteno; y

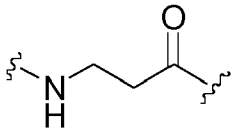
en la que R_a es un enlace o una estructura orgánica que comprende o que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en la que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un cicloctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a



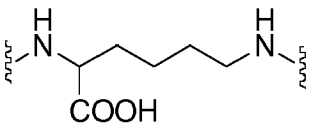
una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



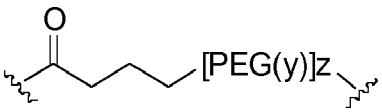
,



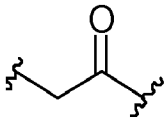
,



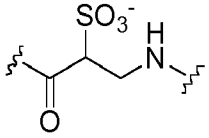
,



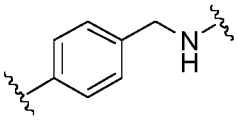
,



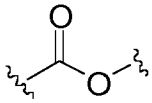
,



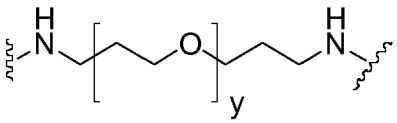
,



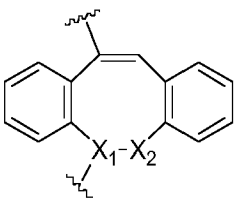
,



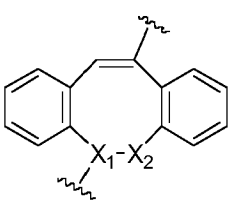
,



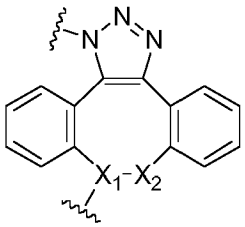
,



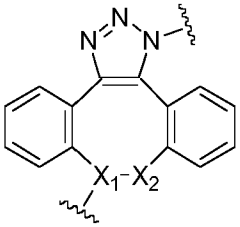
,



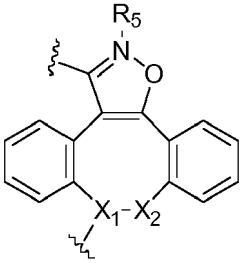
,



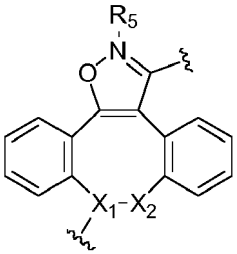
,



,



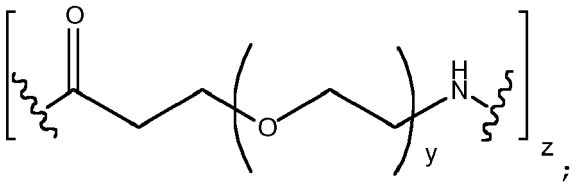
y



;

en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en la que [PEG(y)]z es:



en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunas realizaciones, la cisteína o selenocisteína se produce de manera natural en el tramo de aminoácidos consecutivos. En algunas realizaciones, la cisteína o selenocisteína no se produce de manera natural en el tramo de aminoácidos consecutivos.

En algunas realizaciones, los aminoácidos consecutivos tienen en su extremo N-terminal una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cisteína, selenocisteína, CP, CPXCP (en la que X = P, R o S), CDKTHTCPPCP, CVECPPCP, CCVECPPCP y CDTPPPCPRCP.

En algunas realizaciones, el dominio Fc de un anticuerpo es un dominio Fc que se produce de manera natural de un anticuerpo.

En algunas realizaciones, el dominio Fc de un anticuerpo es un dominio Fc variante de un anticuerpo.

En algunas realizaciones, el dominio Fc variante de un anticuerpo es un dominio Fc mutado de un anticuerpo.

En algunas realizaciones, el dominio Fc mutado es un mutante de sustitución.

En algunas realizaciones, el mutante de sustitución tiene una sustitución de aminoácido en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o en una posición del dominio Fc distinta del extremo N-terminal o el extremo C-terminal.

En algunas realizaciones, el mutante de sustitución tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 sustituciones de aminoácido en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

En algunas realizaciones, las sustituciones son sustituciones de aminoácido conservativas.

En algunas realizaciones, el dominio Fc mutado es un mutante de adición de aminoácido.

En algunas realizaciones, el mutante de adición de aminoácido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 aminoácidos añadidos en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

En algunas realizaciones, el dominio Fc mutado es un mutante de deleción de aminoácido.

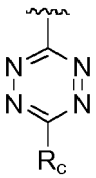
En algunas realizaciones, el mutante de deleción de aminoácido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 aminoácidos delecionados en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

En algunas realizaciones, los aminoácidos consecutivos son idénticos a un tramo de al menos 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 o 190 aminoácidos consecutivos presente en la cadena del dominio Fc del anticuerpo.

En algunas realizaciones, los aminoácidos consecutivos son idénticos al tramo de aminoácidos en la región de bisagra, la región CH2 o la región CH3 del dominio Fc o una porción de las mismas.

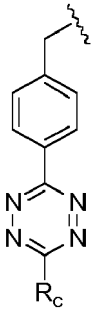
En algunas realizaciones, L es una tetrazina.

En algunas realizaciones, la tetrazina tiene la estructura:

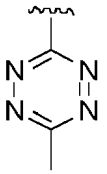


, en la que R_c es H, alquilo o arilo.

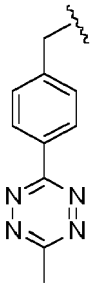
En algunas realizaciones, la tetrazina tiene la estructura:


, en la que R_c es H, alquilo o arilo.

En algunas realizaciones, la tetrazina tiene la estructura:


.

En algunas realizaciones, la tetrazina tiene la estructura:

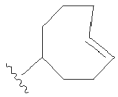

.

En algunas realizaciones, L es trans-cicloocteno.

En algunas realizaciones, el trans-cicloocteno tiene la estructura:


.

En algunas realizaciones, el trans-cicloocteno tiene la estructura:


.

En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende un grupo [PEG(y)]z.

En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende un grupo polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico) o polisacárido.

En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende un grupo alquilo C_1-C_4.

En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende una succinimida.

En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende una amina.

En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende un succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo o adipoílo.

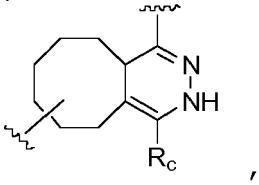
En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende un malonilo.

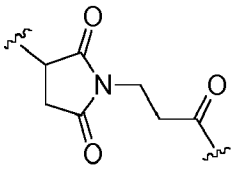
En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende un aminoácido.

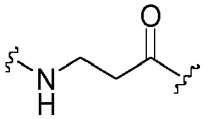
En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende una cisteína.

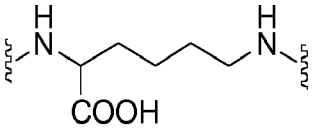
En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que comprende una lisina.

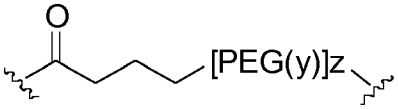
En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que consiste en una cadena de 3 restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

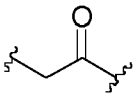


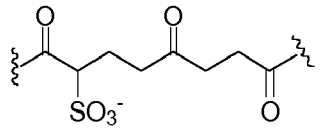
,


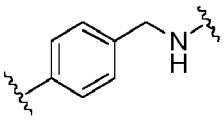
,


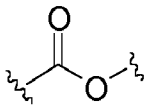
,


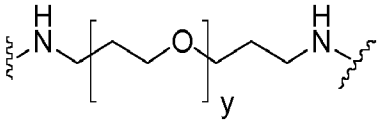
,


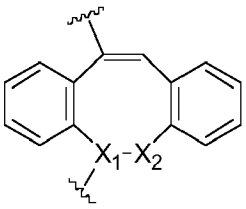
,


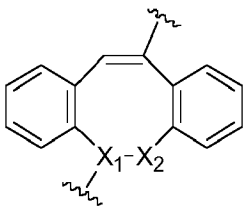
,


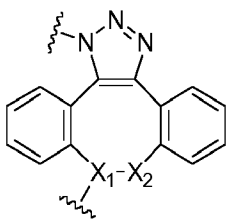
,


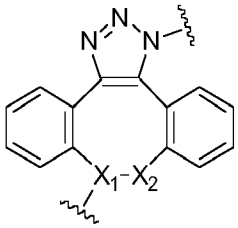
,


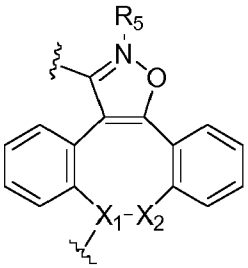
,


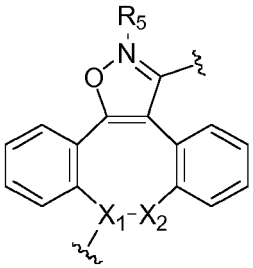
,


,


,


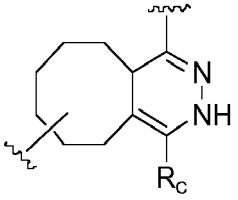
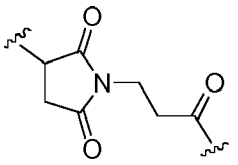
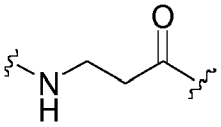
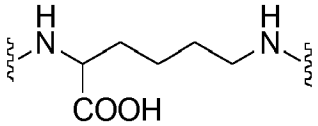
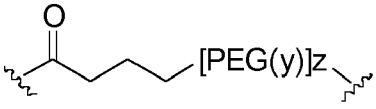
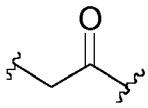
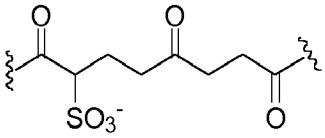
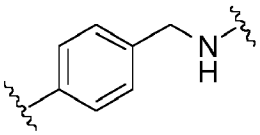
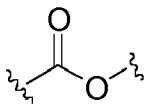
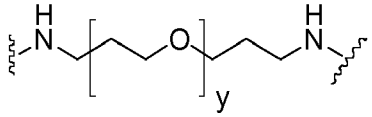
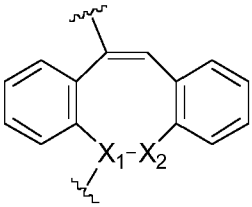
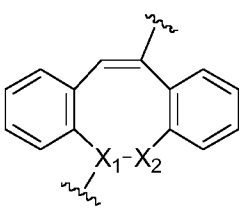
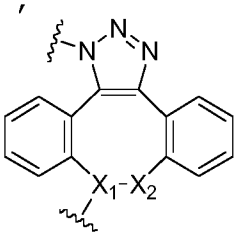
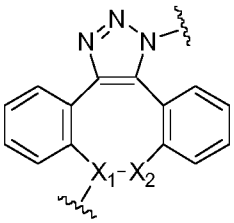
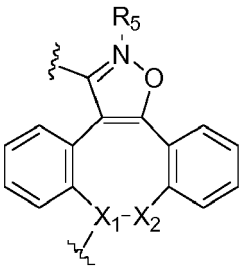
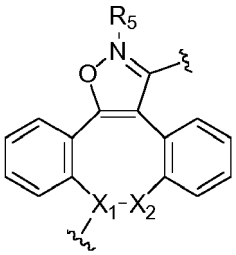
,


,


y


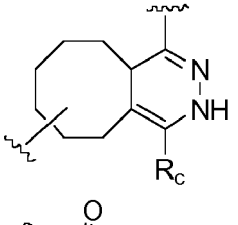
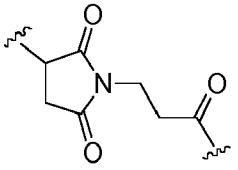
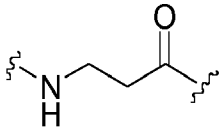
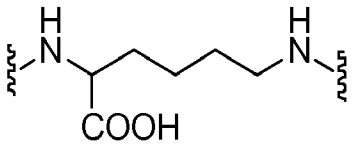
.

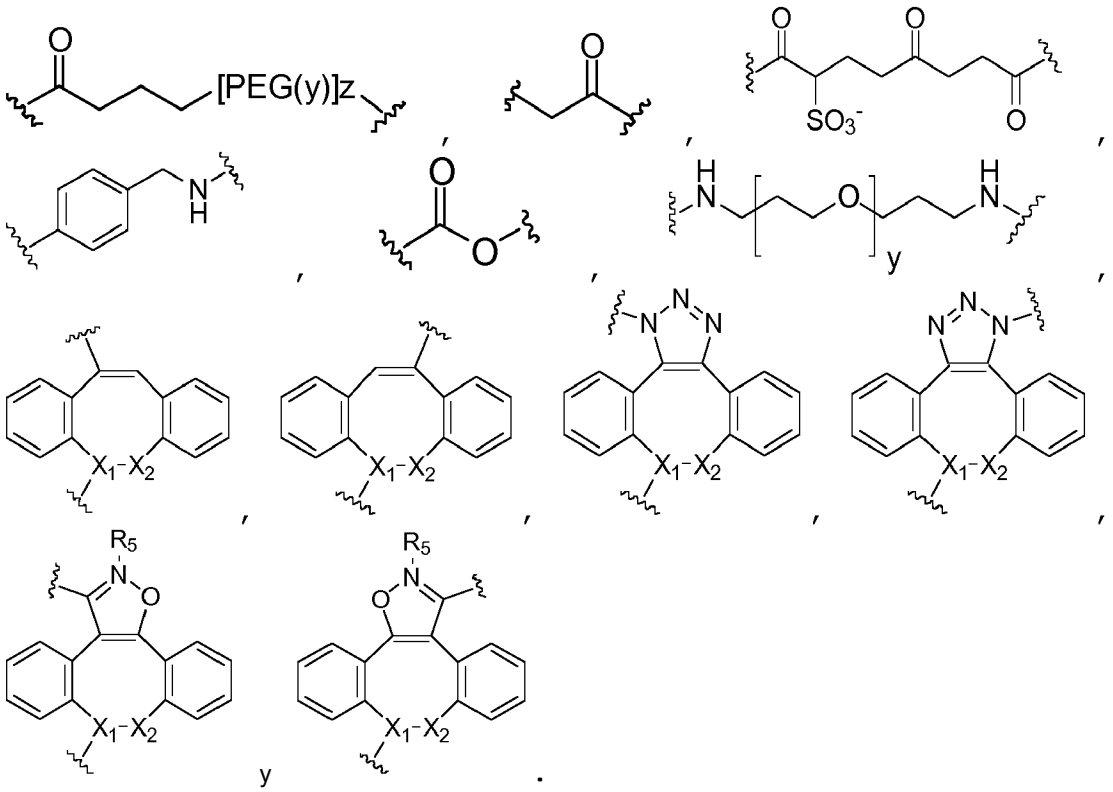
En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que consiste en una cadena de cuatro restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

y .

En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que consiste en una cadena de cinco restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



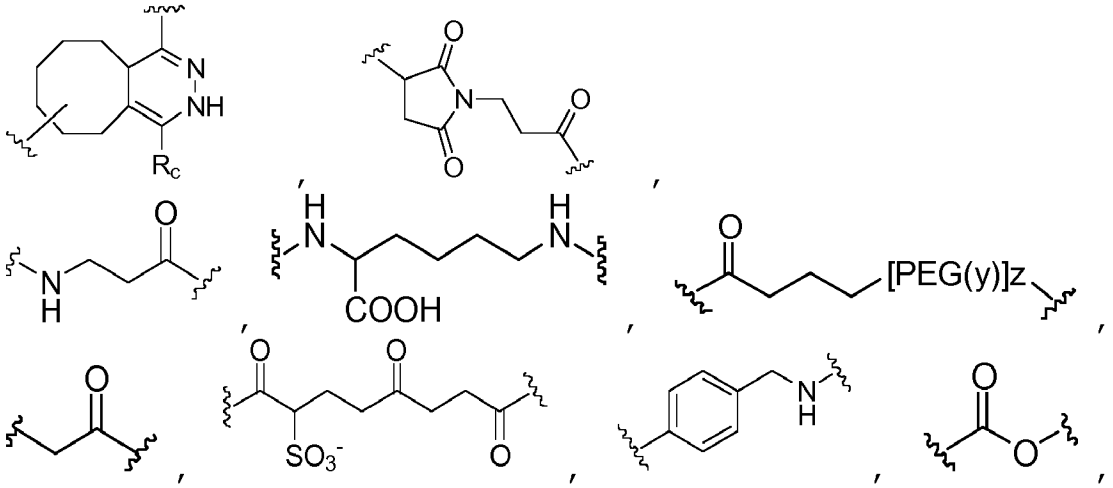
En algunas realizaciones, R_a comprende un grupo [PEG(y)]z unido a una lisina.

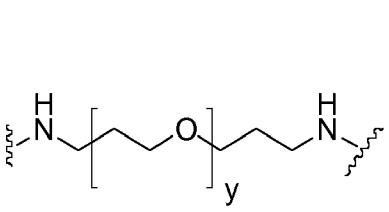
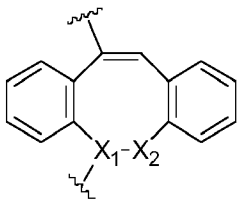
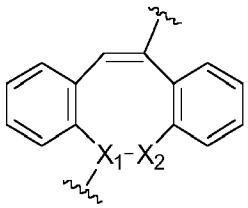
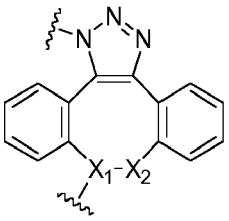
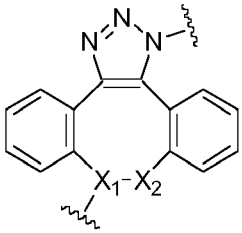
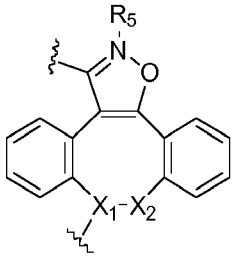
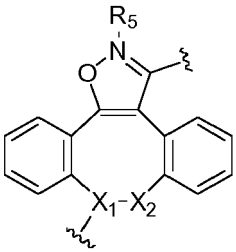
En algunas realizaciones, R_a comprende un grupo acilo C_1-C_4 unido a un grupo succinimida.

En algunas realizaciones, R_a comprende una lisina unida a un acilo C_1-C_4.

En algunas realizaciones, R_a comprende un grupo [PEG(y)]z, que está unido a un glutarilo.

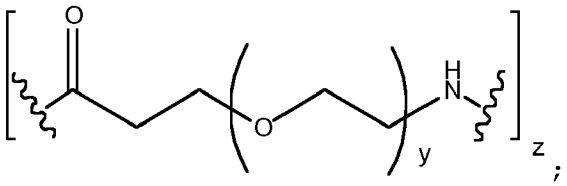
En algunas realizaciones, R_a es una estructura orgánica que consiste en una cadena de tres, cuatro o cinco restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, acilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, un aminoácido, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctenо, un dibenzoazaciclooctenо,









y

;

en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en la que [PEG(y)]z es:


;

en el que y = 1-100 y z = 1-10.

En algunas realizaciones, R_a es un enlace.

En algunas realizaciones, R_a es una cisteína.

En algunas realizaciones, R_a tiene una estructura lineal.

En algunas realizaciones, R_a tiene una estructura ramificada.

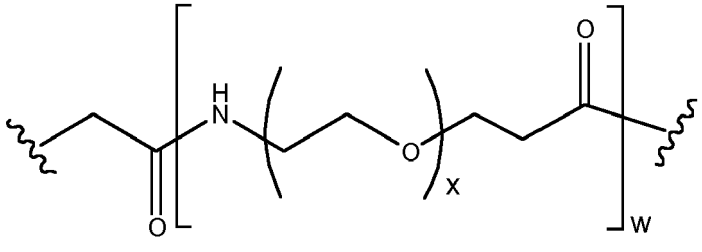
En algunas realizaciones, y es 1-20. En algunas realizaciones, y es 21-40. En algunas realizaciones, y es 41-60. En algunas realizaciones, y es 61-80. En algunas realizaciones, y es 30-50. En algunas realizaciones, y es 12, 24, 36 o 48.

En algunas realizaciones, z es 1.

En algunas realizaciones, el carbonilo terminal del grupo [PEG(y)]z forma parte de un enlace amida.

En algunas realizaciones, la amina terminal del grupo [PEG(y)]z forma parte de un enlace amida.

En algunas realizaciones, R_a es

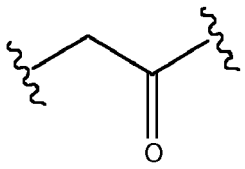


en el que x es 1-100, y w es 0-5.

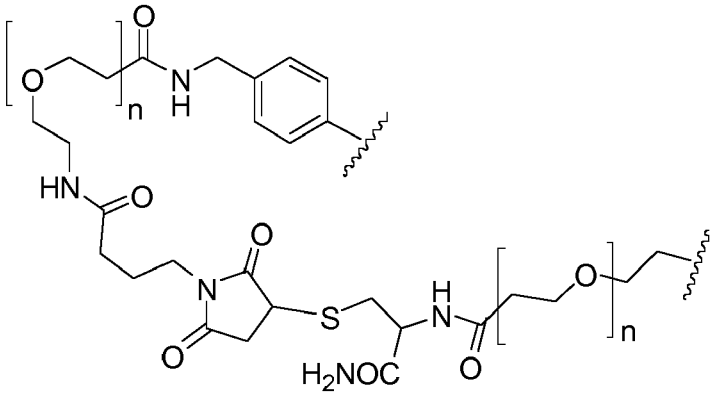
En algunas realizaciones, x es 1-20. En algunas realizaciones, x es 21-40. En algunas realizaciones, x es 41-60. En algunas realizaciones, x es 61-80. En algunas realizaciones, x es 30-50. En algunas realizaciones, x es 12, 24, 36 o 48.

En algunas realizaciones, w es 1. En algunas realizaciones, w es 0.

En algunas realizaciones, R_a tiene la estructura:

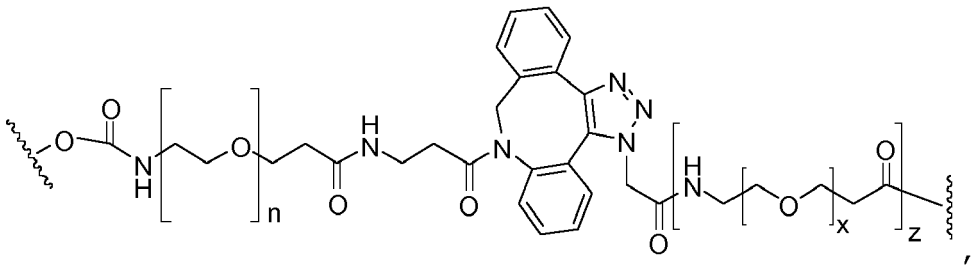


En algunas realizaciones, R_a es:



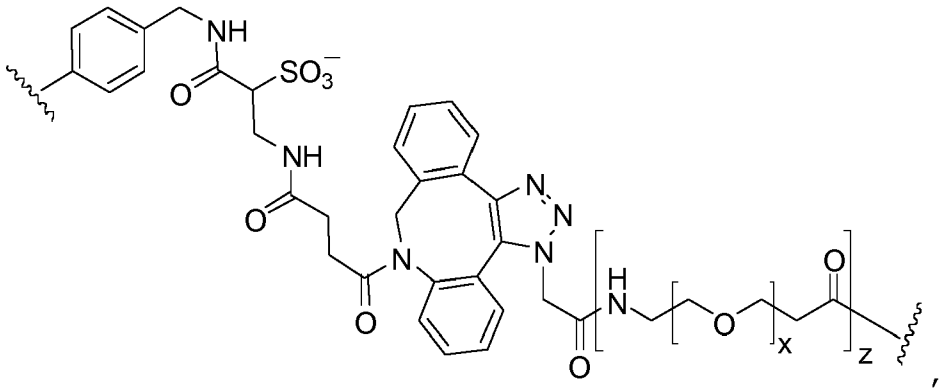
en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50.

En algunas realizaciones, R_a es:



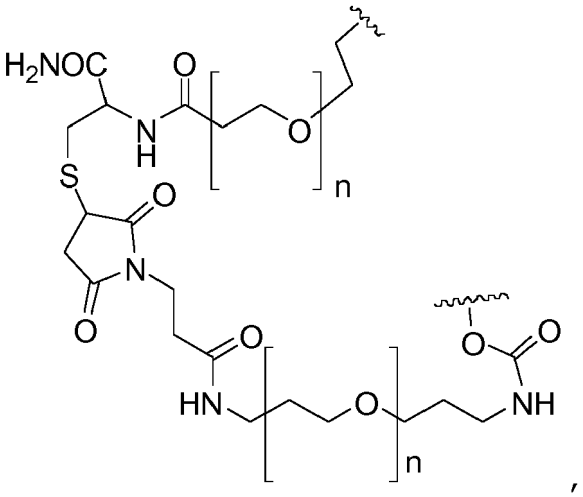
en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50, x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50 y z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50.

En algunas realizaciones, R_a es:



en el que x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50 y z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50.

En algunas realizaciones, R_a es:



en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50.

En otro aspecto no cubierto por la presente invención, la memoria descriptiva describe un procedimiento para producir un compuesto que tiene la estructura:

A——B- - - -Z

en la que A es una estructura biológicamente activa del compuesto;

en la que Z es un componente de proteína del compuesto, componente de proteína que comprende uno o más polipéptidos, en el que al menos uno de los uno o más polipéptidos comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una cisteína o una selenocisteína;

en la que B es una estructura química que une A y Z;

en la que la línea discontinua entre B y Z representa una unión peptidilo;

en la que la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo;

que comprende las siguientes etapas:

a) obtener un A' que comprende A o un derivado de A, y un primer grupo reactivo terminal;

b) obtener un B' que comprende B o un derivado de B, un segundo grupo reactivo terminal y un tercer grupo reactivo terminal, en el que el segundo grupo reactivo terminal puede reaccionar con el primer grupo reactivo terminal para formar una unión distinta de peptidilo;

c) obtener un Z' que comprende Z o un derivado de Z, y un cuarto grupo reactivo terminal, en el que el cuarto grupo

reactivo terminal puede reaccionar con el tercer grupo reactivo terminal para formar una unión peptidilo; y

d) hacer reaccionar A', B' y Z' en cualquier orden para producir el compuesto.

En algunos aspectos, la cisteína o selenocisteína se produce de manera natural en el tramo de aminoácidos consecutivos. En algunos aspectos, la cisteína o selenocisteína no se produce de manera natural en el tramo de aminoácidos consecutivos.

En algunos aspectos, los aminoácidos consecutivos tienen en su extremo N-terminal una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cisteína, selenocisteína, CP, CPXCP (en la que X = P, R o S), CDKTHTCPPCP, CVECPPCP, CCVECPPCP y CDTPPPCPRCP.

En algunos aspectos, el dominio Fc de un anticuerpo es un dominio Fc que se produce de manera natural de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el dominio Fc de un anticuerpo es un dominio Fc variante de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el dominio Fc variante de un anticuerpo es un dominio Fc mutado de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el dominio Fc mutado es un mutante de sustitución.

En algunos aspectos, el mutante de sustitución tiene una sustitución de aminoácido en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o en una posición del dominio Fc distinta del extremo N-terminal o el extremo C-terminal.

En algunos aspectos, el mutante de sustitución tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 sustituciones de aminoácido en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

En algunos aspectos, las sustituciones son sustituciones de aminoácido conservativas.

En algunos aspectos, el dominio Fc mutado es un mutante de adición de aminoácido.

En algunos aspectos, el mutante de adición de aminoácido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 aminoácidos añadidos en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

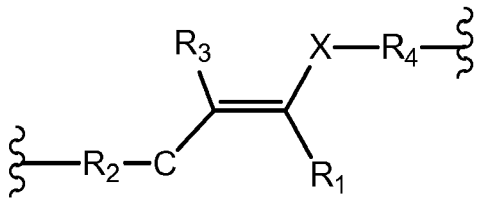
En algunos aspectos, el dominio Fc mutado es un mutante de deleción de aminoácido.

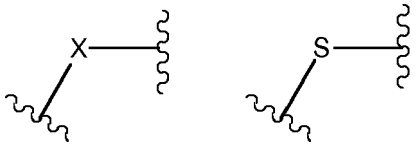
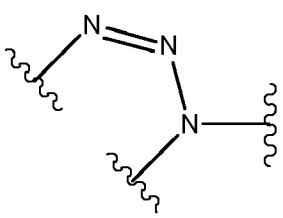
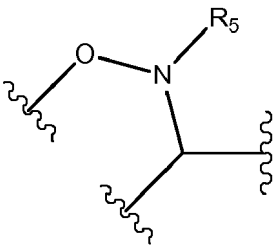
En algunos aspectos, el mutante de deleción de aminoácido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 10-20 o 20-50 aminoácidos delecionados en el tramo de aminoácidos consecutivos del mismo.

En algunos aspectos, los aminoácidos consecutivos son idénticos a un tramo de al menos 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 o 190 aminoácidos consecutivos presente en la cadena del dominio Fc del anticuerpo.

En algunos aspectos, los aminoácidos consecutivos son idénticos al tramo de aminoácidos en la región de bisagra, la región CH2 o la región CH3 del dominio Fc o una porción de las mismas.

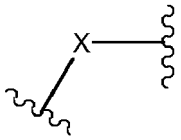
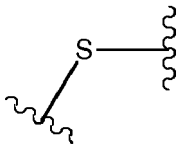
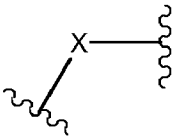
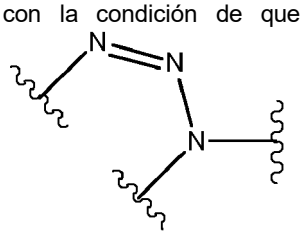
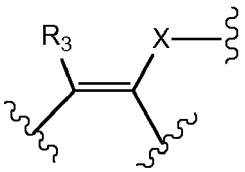
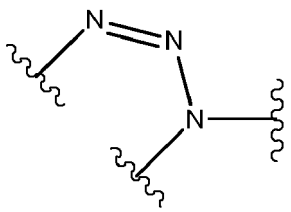
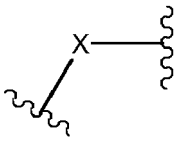
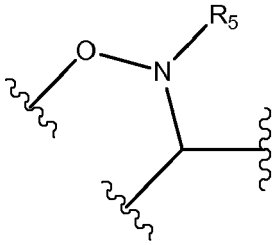
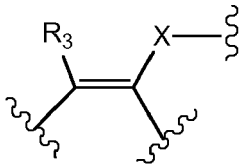
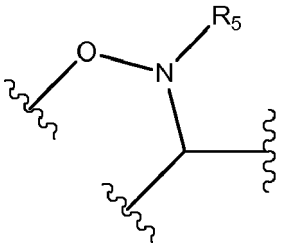
En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



en la que es  ,  , o 
en el que R_5 es un grupo alquilo o arilo

en la que R_1 es H o forma parte de una estructura adicional que es una estructura cíclica, en la que la estructura cíclica

adicional comprende R_1 o una porción de R_1, y también puede comprender R_2 o una porción de R_2, y el carbono entre R_2 y el doble enlace de alqueno;

con la condición de que si  es  , R_3 es un H; si  es  ,  es un anillo de triazol que comprende  , y si  es  ,  es un anillo de isoxazolina sustituido con N-alquilo o arilo que comprende  ; y

en la que R_2 representa una estructura orgánica que se conecta a uno de A o B y R_4 representa una estructura orgánica que se conecta al otro de A o B;

que comprende las siguientes etapas:

a) obtener un A' que comprende A o un derivado de A, y un primer grupo reactivo terminal;

b) obtener un B' que comprende B o un derivado de B, un segundo grupo reactivo terminal y un tercer grupo reactivo terminal, en el que el segundo grupo reactivo terminal puede reaccionar con el primer grupo reactivo terminal para formar una unión distinta de peptidilo;

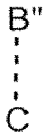
c) obtener un C' que comprende C o un derivado de C, y un cuarto grupo reactivo terminal, en el que el cuarto grupo reactivo terminal puede reaccionar con el tercer grupo reactivo terminal para formar una unión peptidilo; y

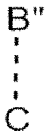
d) hacer reaccionar A', B' y C' en cualquier orden para producir el compuesto.

En algunos aspectos, la etapa d) se realiza haciendo reaccionar en primer lugar A' y B' para producir  ; en el que B" comprende B y el tercer grupo reactivo terminal, y la línea continua entre B" y A representa una unión distinta



de peptidilo; y después hacer reaccionar con C' para producir el compuesto.

En algunos aspectos, la etapa d) se realiza haciendo reaccionar en primer lugar C' y B' para producir  ; en el que B" comprende B y el segundo grupo reactivo terminal, y la línea discontinua entre B" y C representa una unión peptidilo;



y después hacer reaccionar con A' para producir el compuesto.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida, un tiol, una nitrona o un alquino.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un alquino.

En algunos aspectos, el alquino es un cicloalquino.

En algunos aspectos, el alquino es un anillo de ocho miembros.

En algunos aspectos, el alquino es un azaciclooctino.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un biarilazaciclooctino.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un ciclooctino.

En algunos aspectos, el alquino es un alquino terminal.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida, tiol o nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un tiol.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una N-alquil-nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una N-aril-nitrona.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una azida, un tiol, una nitrona o un alquino.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es un alquino.

En algunos aspectos, el alquino es un cicloalquino.

En algunos aspectos, el alquino es un anillo de ocho miembros.

En algunos aspectos, el alquino es un azaciclooctino.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un biarilazaciclooctino.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un ciclooctino.

En algunos aspectos, el alquino es un alquino terminal.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una azida, tiol o nitrona.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una azida.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es un tiol.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una nitrona.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una N-alquil-nitrona.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una N-aril-nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un alquino terminal y el segundo grupo reactivo terminal es

una azida, tiol o nitrona.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una azida.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es un tiol.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una nitrona.

En algunos aspectos, la nitrona es una N-alquil o N-aril-nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida, tiol o nitrona, y el segundo grupo reactivo terminal es un alquino terminal.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un tiol.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una nitrona.

En algunos aspectos, la nitrona es una N-alquil o N-aril-nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un cicloalquino y el segundo grupo reactivo terminal es una azida, tiol o nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un tiol.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una nitrona.

En algunos aspectos, la nitrona es una N-alquil o N-aril-nitrona.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida, tiol o nitrona, y el segundo grupo reactivo terminal es un cicloalquino.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un tiol.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una nitrona.

En algunos aspectos, la nitrona es una N-alquil o N-aril-nitrona.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un anillo de ocho miembros.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un azaciclooctino.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un biarilazaciclooctino.

En algunos aspectos, el cicloalquino es un ciclooctino.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una azida y el segundo grupo reactivo terminal es un alquino terminal; o el primer grupo reactivo terminal es una azida y el segundo grupo reactivo terminal es un cicloalquino; o el primer grupo reactivo terminal es un tiol y el segundo grupo reactivo terminal es un cicloalquino; o el primer grupo reactivo terminal es una N-alquil-nitrona o N-aril-nitrona y el segundo grupo reactivo terminal es un ciclooctino.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una azida y el primer grupo reactivo terminal es un alquino terminal; o el segundo grupo reactivo terminal es una azida y el primer grupo reactivo terminal es un cicloalquino; o el segundo grupo reactivo terminal es un tiol y el primer grupo reactivo terminal es un cicloalquino; o el segundo grupo reactivo terminal es una N-alquil-nitrona o N-aril-nitrona y el primer grupo reactivo terminal es un ciclooctino.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal y el segundo grupo reactivo terminal reaccionan para producir un triazol, tioleno, N-alquil-isoxazolina o N-aril-isoxazolina.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal y el segundo grupo reactivo terminal reaccionan para producir un triazol.

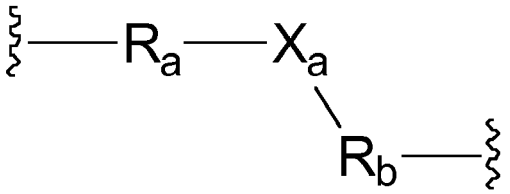
En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal y el segundo grupo reactivo terminal reaccionan para producir un tioleno.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal y el segundo grupo reactivo terminal reaccionan para producir

una N-alquil-isoxazolina o N-aril-isoxazolina.

En algunos aspectos, la reacción del primer grupo reactivo con el segundo grupo reactivo da como resultado un rendimiento de al menos el 80%, 85% o 90% de la reacción en menos de 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 o 72 horas.

En algunos aspectos, la línea continua entre A y B representa una unión distinta de peptidilo que comprende la estructura:



en la que X_a es una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina; y

en la que R_a representa una estructura orgánica que se conecta a uno de A o B y R_b representa una estructura orgánica que se conecta al otro de A o B.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un trans-cicloocteno o una tetrazina.

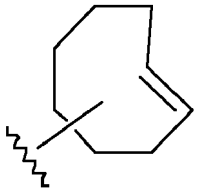
En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un trans-cicloocteno.

En algunos aspectos, el alquino es una tetrazina.

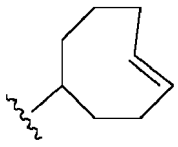
En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es un trans-cicloocteno o una tetrazina.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es un trans-cicloocteno.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal tiene la estructura:

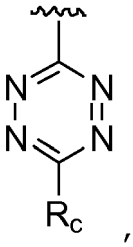


En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal tiene la estructura:



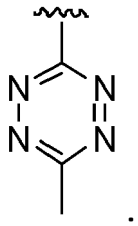
En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal es una tetrazina.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal tiene la estructura:



en la que R_c es H, alquilo o arilo.

En algunos aspectos, el segundo grupo reactivo terminal tiene la estructura:



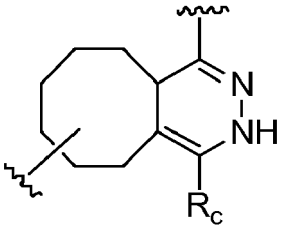
.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es un trans-ciclooctenо y el segundo grupo reactivo terminal es una tetrazina.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal es una tetrazina y el segundo grupo reactivo terminal es un trans-ciclooctenо.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal y el segundo grupo reactivo terminal reaccionan para producir una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina.

En algunos aspectos, el primer grupo reactivo terminal y el segundo grupo reactivo terminal reaccionan para producir la estructura química:



,

en la que R_c es H, alquilo o arilo;

o un tautómero de la misma.

En algunos aspectos, el tercer grupo reactivo y el cuarto grupo reactivo terminal son cada uno independientemente un aminoácido o derivado de aminoácido.

En algunos aspectos, el tercer grupo reactivo es una treonina o derivado de treonina.

En algunos aspectos, el tercer grupo reactivo es un derivado tioéster de un aminoácido.

En algunos aspectos, el cuarto grupo reactivo es cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína, o un derivado de cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína.

En algunos aspectos, el cuarto grupo reactivo es cisteína o un derivado de cisteína.

En algunos aspectos, el cuarto grupo reactivo es cisteína.

En algunos aspectos, A’ se prepara mediante las siguientes etapas:

i) obtener un A” que comprende A o un derivado de A, y un tramo de aminoácidos consecutivos que comprende una inteína;

ii) obtener un residuo de cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína sustituido, o un derivado sustituido de un residuo de cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína, en el que el residuo de cisteína está sustituido en el extremo C-terminal con una estructura orgánica que contiene un alquino, una azida, un tiol o una nitrona; y

iii) hacer reaccionar A” con el residuo de cisteína sustituido para producir A’.

En algunos aspectos, la estructura orgánica que contiene un alquino es N-propargil-amina.

En algunos aspectos, A’ se prepara mediante las siguientes etapas:

i) obtener un A” que comprende A o un derivado de A, y que comprende al menos un grupo tiol libre;

ii) obtener un compuesto que comprende un primer grupo reactivo terminal y una maleimida terminal; y

iii) hacer reaccionar A” con el compuesto de la etapa ii) para producir A’.

En algunos aspectos, A” se prepara mediante las siguientes etapas:

a) obtener un A’’’, en el que A’’’ es un polipéptido que comprende A o un derivado de A, y que comprende al menos un enlace disulfuro; y

b) tratar A’’’ con mercaptoetilamina (MEA) para producir A”.

En algunos aspectos, el A’’’ se prepara mediante las siguientes etapas:

a) obtener un anticuerpo monoclonal que comprende A o derivado de A, y que comprende al menos un enlace disulfuro; y

b) tratar el polipéptido de la etapa a) con IdeS para producir A’’’.

En algunos aspectos, el anticuerpo monoclonal se une a TNFα.

En algunos aspectos, el anticuerpo monoclonal es adalimumab.

En algunos aspectos, si R_1 es hidrógeno y el primer grupo reactivo terminal es alquino, entonces en la etapa d) se hace reaccionar B’ en presencia de un catalizador de metal.

En algunos aspectos, si R_1 es hidrógeno y el segundo grupo reactivo terminal es alquino, entonces en la etapa d) se hace reaccionar B’ en presencia de un catalizador de metal.

En algunos aspectos, el catalizador de metal es Ag(I) o Cu(I).

En algunos aspectos, A’ comprende uno o más residuos ramificados, en el que cada residuo ramificado comprende un primer grupo reactivo terminal adicional.

En algunos aspectos, B’ comprende uno o más residuos ramificados, en el que cada residuo ramificado comprende un segundo grupo reactivo terminal adicional.

En algunos aspectos, B’ comprende uno o más residuos ramificados, en el que cada residuo ramificado comprende un tercer grupo reactivo terminal adicional.

En algunos aspectos, el residuo ramificado es un residuo de aminoácido.

En algunos aspectos, el residuo de aminoácido es una lisina o un derivado de lisina, arginina o un derivado de arginina, ácido aspártico o un derivado de ácido aspártico, ácido glutámico o un derivado de ácido glutámico, asparaginas o un derivado de asparaginas, glutamina o derivado de glutamina, tirosina o derivado de tirosina, cisteína o derivado de cisteína u ornitina o derivado de ornitina.

En algunos aspectos, el residuo de aminoácido está sustituido en la posición N con un residuo que contiene un grupo reactivo amino o carbonilo terminal.

En algunos aspectos, el residuo ramificado es un residuo orgánico que contiene dos o más grupos amino terminales o dos o más grupos carbonilo terminales.

En algunos aspectos, el residuo orgánico es ácido iminodipropiónico, ácido iminodiacético, ácido 4-amino-pimélico, ácido 4-amino-heptanodioico, ácido 3-aminohexanodioico, ácido 3-aminoadípico, ácido 2-aminooctanodioico o ácido 2-amino-6-carbonil-heptanodioico.

En algunos aspectos, el procedimiento se realiza en ausencia de un agente reductor distinto de tiol.

En algunos aspectos, el procedimiento se realiza en ausencia de un agente reductor de tiol.

En algunos aspectos, el procedimiento se realiza en presencia de un agente reductor de tiol.

En algunos aspectos, el procedimiento se realiza con un rendimiento global del 80% o superior.

En algunos aspectos, el procedimiento se realiza con un rendimiento global del 90% o superior.

En algunos aspectos, hacer reaccionar el primer grupo reactivo con el segundo grupo reactivo da como resultado un rendimiento de al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85% o 90% de la reacción en menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 60 minutos.

En algunos aspectos, B es un residuo de ácido orgánico.

En algunos aspectos, B es un tramo de 1-50 residuos de aminoácido, y opcionalmente, un residuo de ácido orgánico.

En algunos aspectos, B es un tramo de 1-10 aminoácidos consecutivos.

En algunos aspectos, B comprende un tramo de aminoácidos consecutivos en la secuencia o una porción de los mismos, EPKSCDKTHTCPPCP, ERKCCVECPPCP, ELKTPLGDTTHTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)3, ESKYGPPCPSCP.

En algunos aspectos, B tiene una treonina en su extremo C-terminal.

En algunos aspectos, Z comprende un C, en el que C es un primer polipéptido, primer polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cisteína, selenocisteína, CP, CPXCP (en la que X = P, R o S), CDKTHTCPPCP, CVECPPCP, CCVECPPCP y CDTPPPCPRCP.

En algunos aspectos, C comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una secuencia que comprende una cisteína que se produce de manera natural seleccionada del grupo que consiste en CP, CPXCP (en la que X = P, R o S), CDKTHTCPPCP, CVECPPCP, CCVECPPCP y CDTPPPCPRCP.

En algunos aspectos, C es un componente de polipéptido del compuesto, componente de polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una secuencia que comprende una cisteína que no se produce de manera natural o selenocisteína.

En algunos aspectos, C comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena de un dominio Fc de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

En algunos aspectos, C comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena de un dominio Fc6 de un anticuerpo.

En algunos aspectos, C comprende además aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un anticuerpo distinta de una cadena de un dominio Fc del anticuerpo.

En algunos aspectos, C comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena pesada de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

En algunos aspectos, C comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena ligera de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

En algunos aspectos, Z comprende además un segundo polipéptido, segundo polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un anticuerpo distinta de una cadena de un dominio Fc del anticuerpo.

En algunos aspectos, el segundo polipéptido comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena pesada de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el segundo polipéptido comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena ligera de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

En algunos aspectos, Z comprende un anticuerpo o una porción del mismo.

En algunos aspectos, Z comprende al menos un Fab o Fab' de un anticuerpo, o una porción del al menos un Fab o Fab'.

En algunos aspectos, Z comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 copias del Fab o Fab' o porción de los mismos.

En algunos aspectos, Z comprende Fab-1 o Fab'1 o una porción de los mismos de un anticuerpo.

En algunos aspectos, Z comprende Fab-2 o Fab'2 o una porción de los mismos de un anticuerpo.

En algunos aspectos, Z comprende dos manos de Fab o Fab' de un anticuerpo.

En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE.

En algunos aspectos, el Fab o Fab' está presente en adalimumab.

En algunos aspectos, Z comprende al menos un tramo de aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en un anticuerpo de cadena sencilla.

En algunos aspectos, el extremo C-terminal de C comprende un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una

cadena de un dominio Fc de un anticuerpo que se ha modificado.

En algunos aspectos, el extremo C-terminal de C es una cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína, o un derivado de cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína.

En algunos aspectos, B está unido a Z mediante una unión peptidilo entre una cisteína o selenocisteína N-terminal de un polipéptido de Z y un residuo de aminoácido o un residuo de ácido orgánico de B.

En algunos aspectos, Z comprende un segundo polipéptido, y B está unido a Z mediante una unión peptidilo entre la cisteína o selenocisteína N-terminal del segundo polipéptido de Z y un residuo de aminoácido o un residuo de ácido orgánico de B.

En algunos aspectos, B está unido a C mediante una unión peptidilo entre la cisteína o selenocisteína N-terminal de C y un residuo de aminoácido o un residuo de ácido orgánico de B.

En algunos aspectos, Z comprende un polipéptido, que es C.

En algunos aspectos, Z comprende dos polipéptidos, que son C y un segundo polipéptido.

La presente invención proporciona homodímeros y heterodímeros que comprenden compuestos de la invención.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero puede unirse al otro mediante al menos un enlace disulfuro.

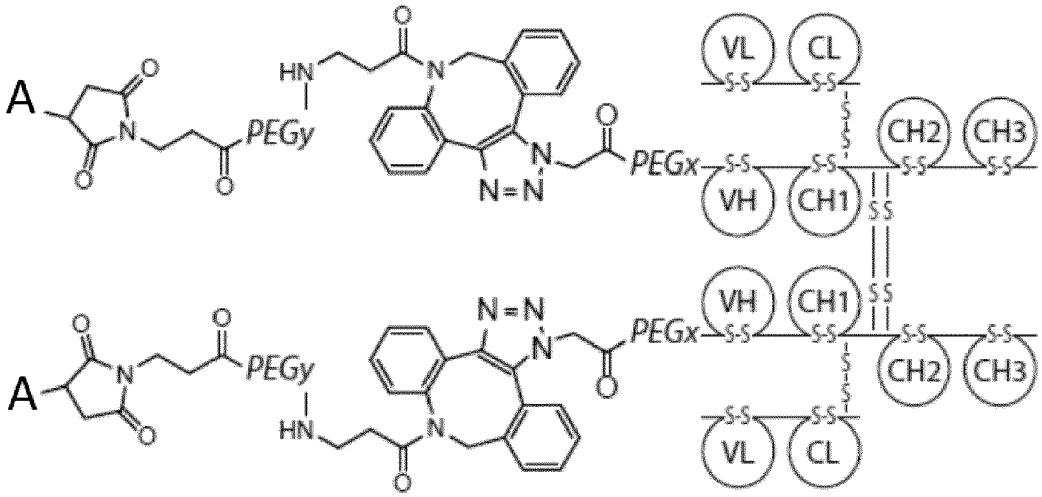
En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero puede unirse al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el C o el segundo polipéptido de cada compuesto.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero está unido al otro mediante al menos un enlace disulfuro.

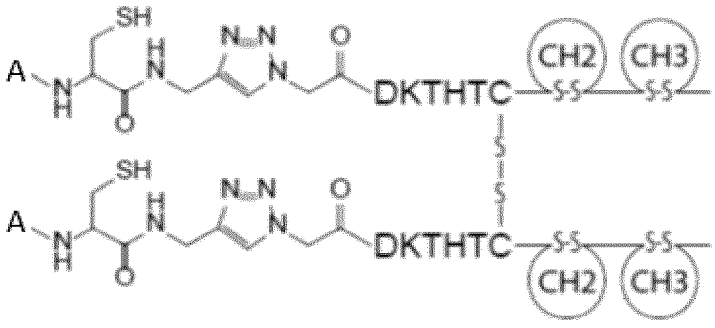
En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero está unido al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el C o el segundo polipéptido de cada compuesto.

En algunas realizaciones, cada compuesto del dímero está unido de manera no covalente al otro.

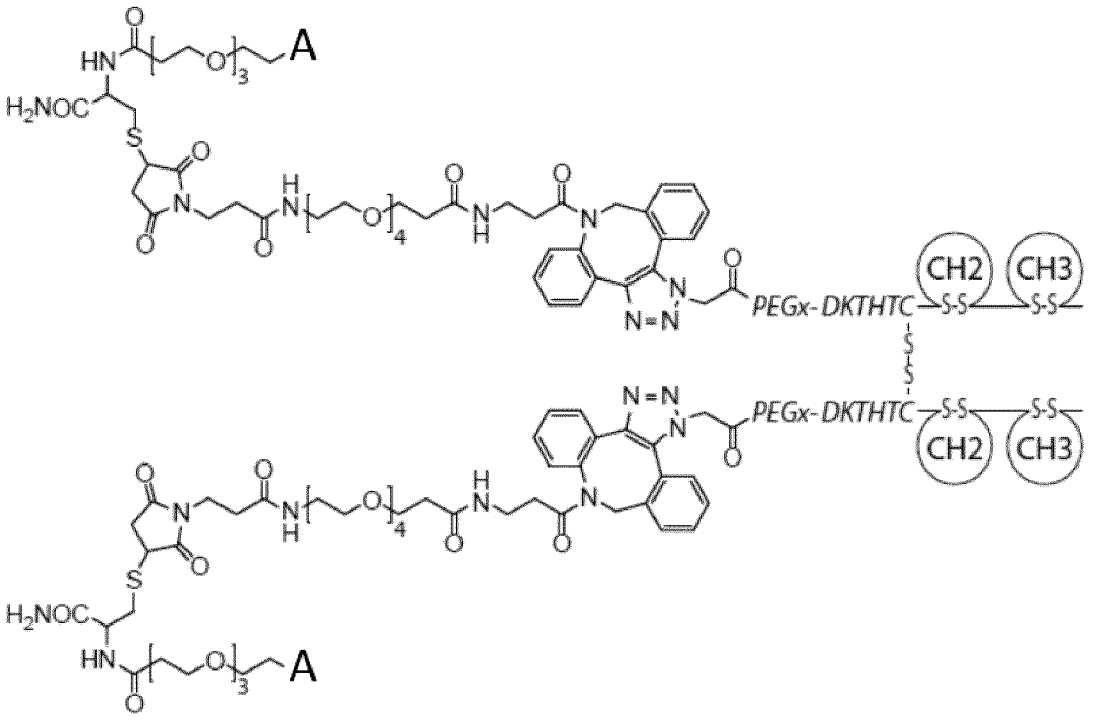
En algunas realizaciones, el dímero es:



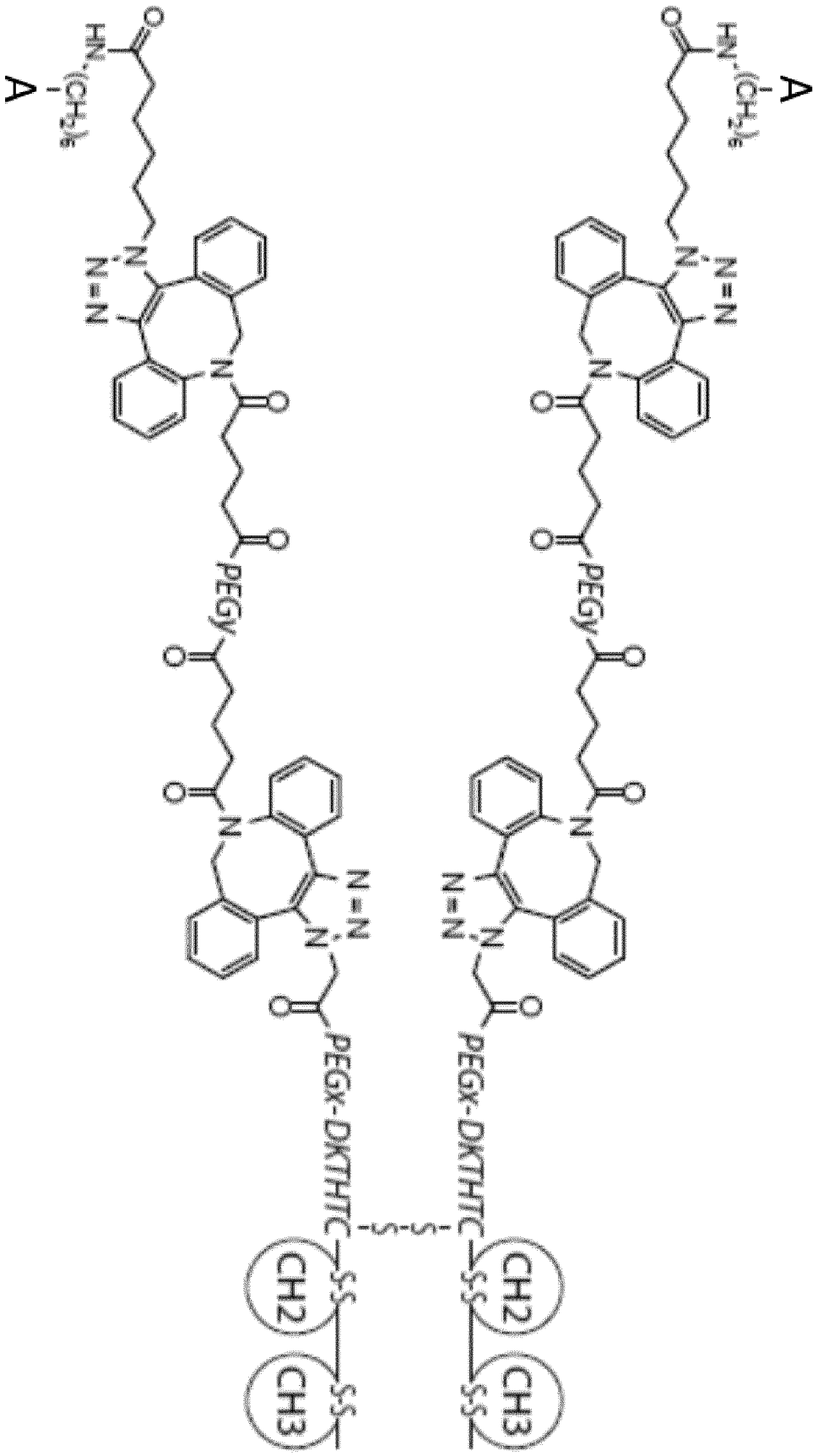
;

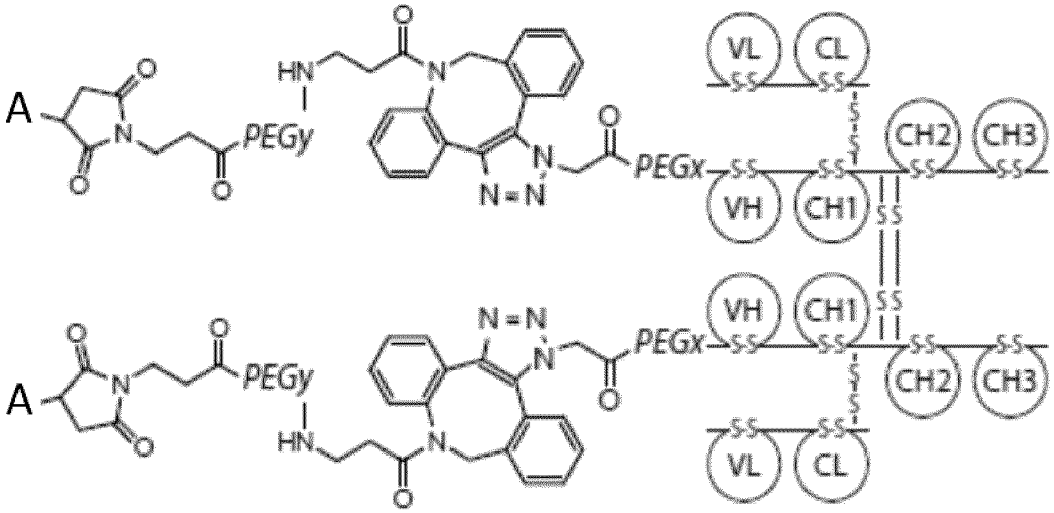


;

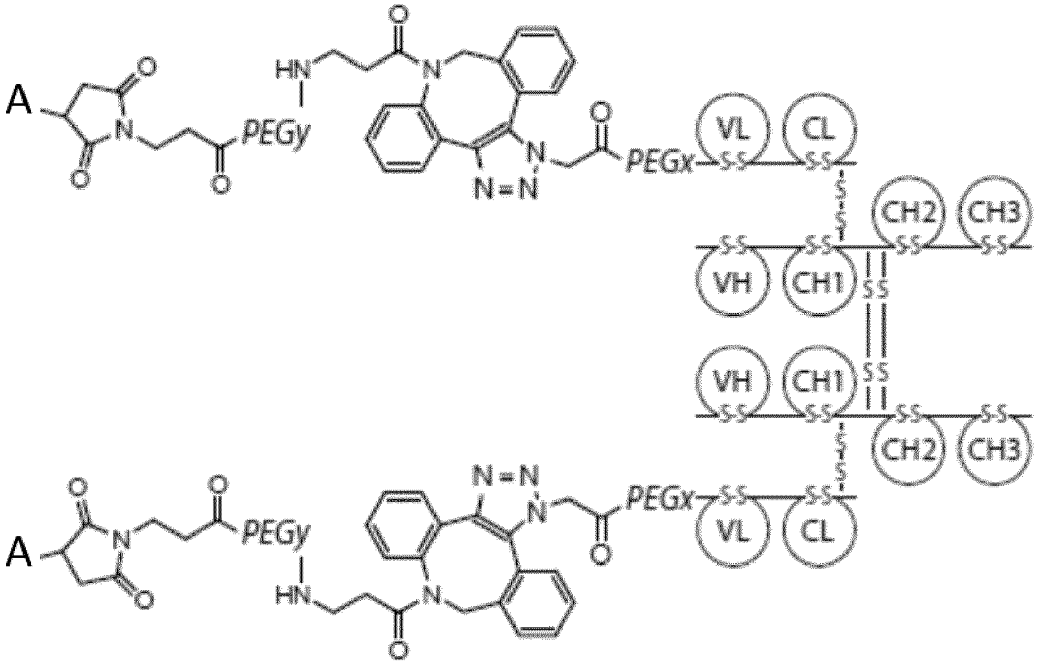

A
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
A

;

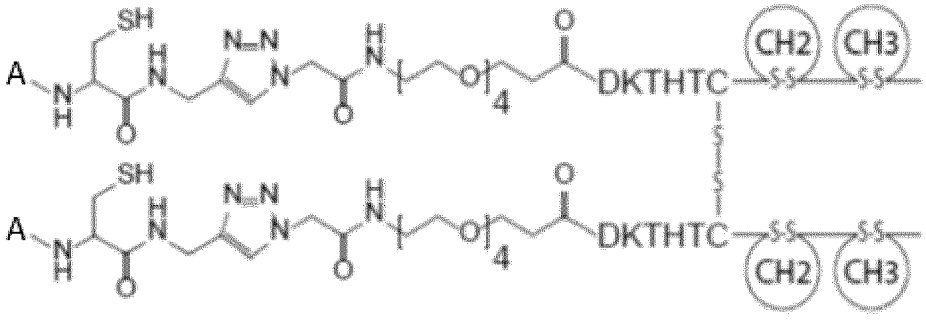

A
PEGy
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3


A
PEGy
HN
N
N=N
PEGx
VL
CL
VH
CH1
CH2
CH3
SS

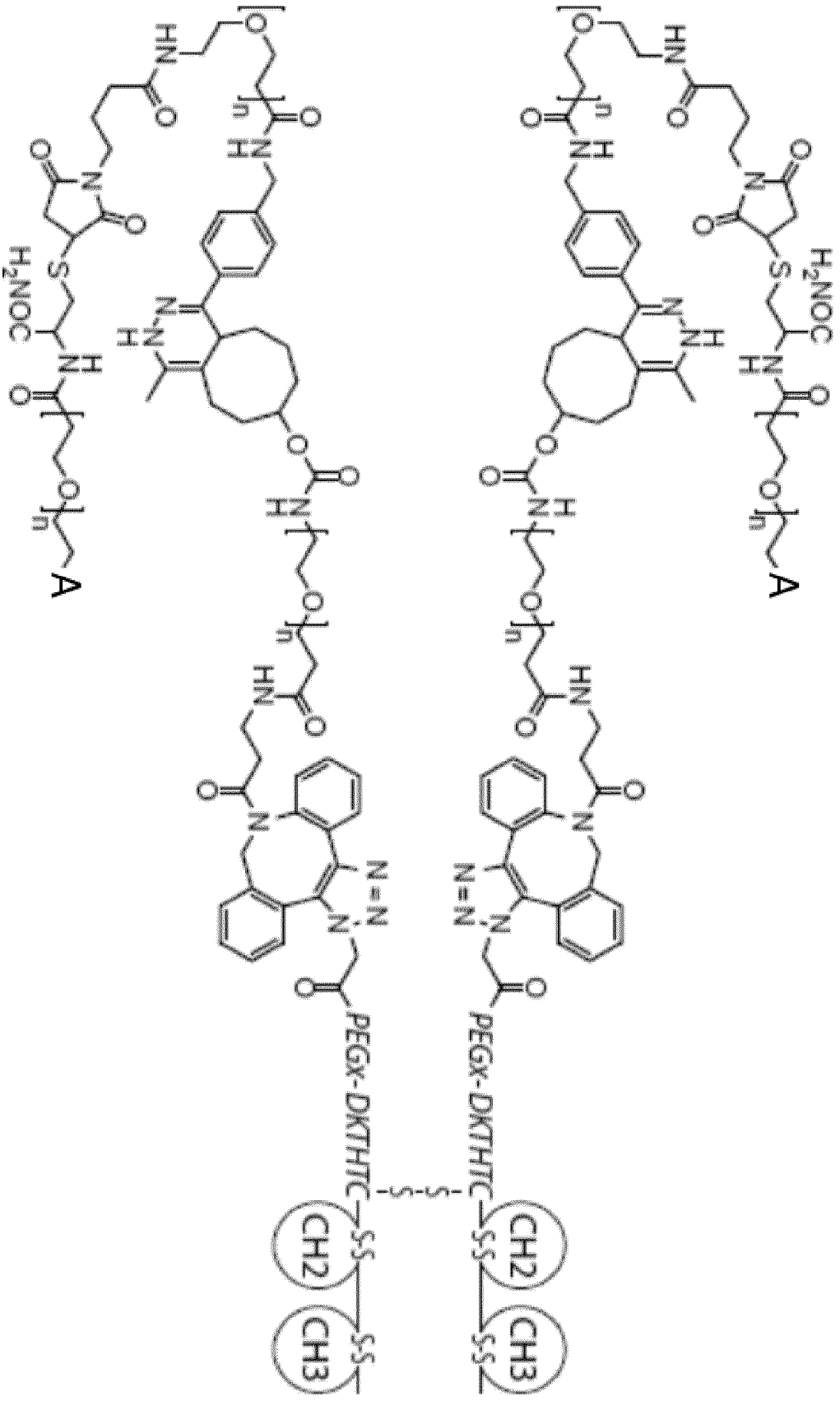
;

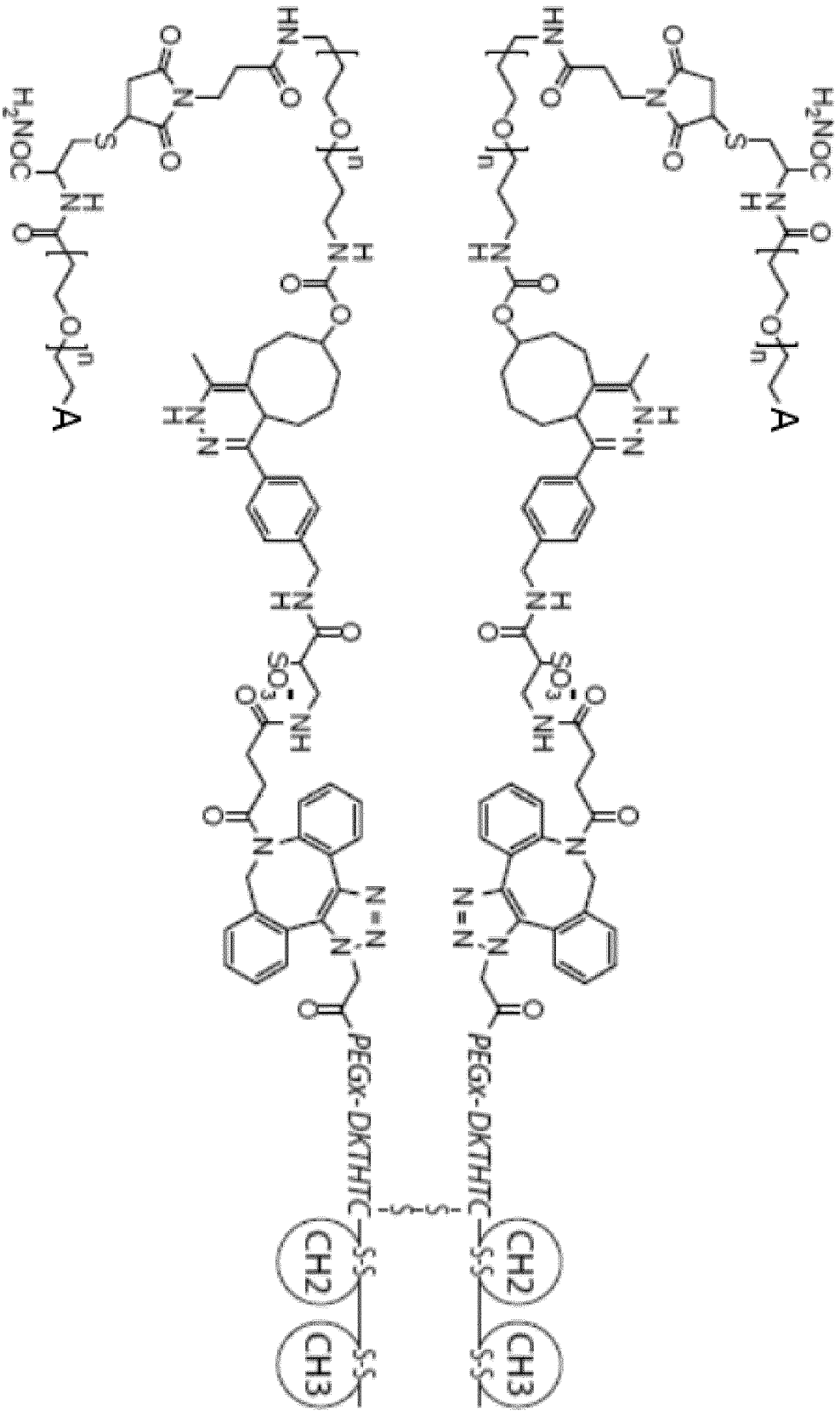

A
PEGy
HN
N
N=N
PEGx
VL
CL
VH
CH1
CH2
CH3
SS

;

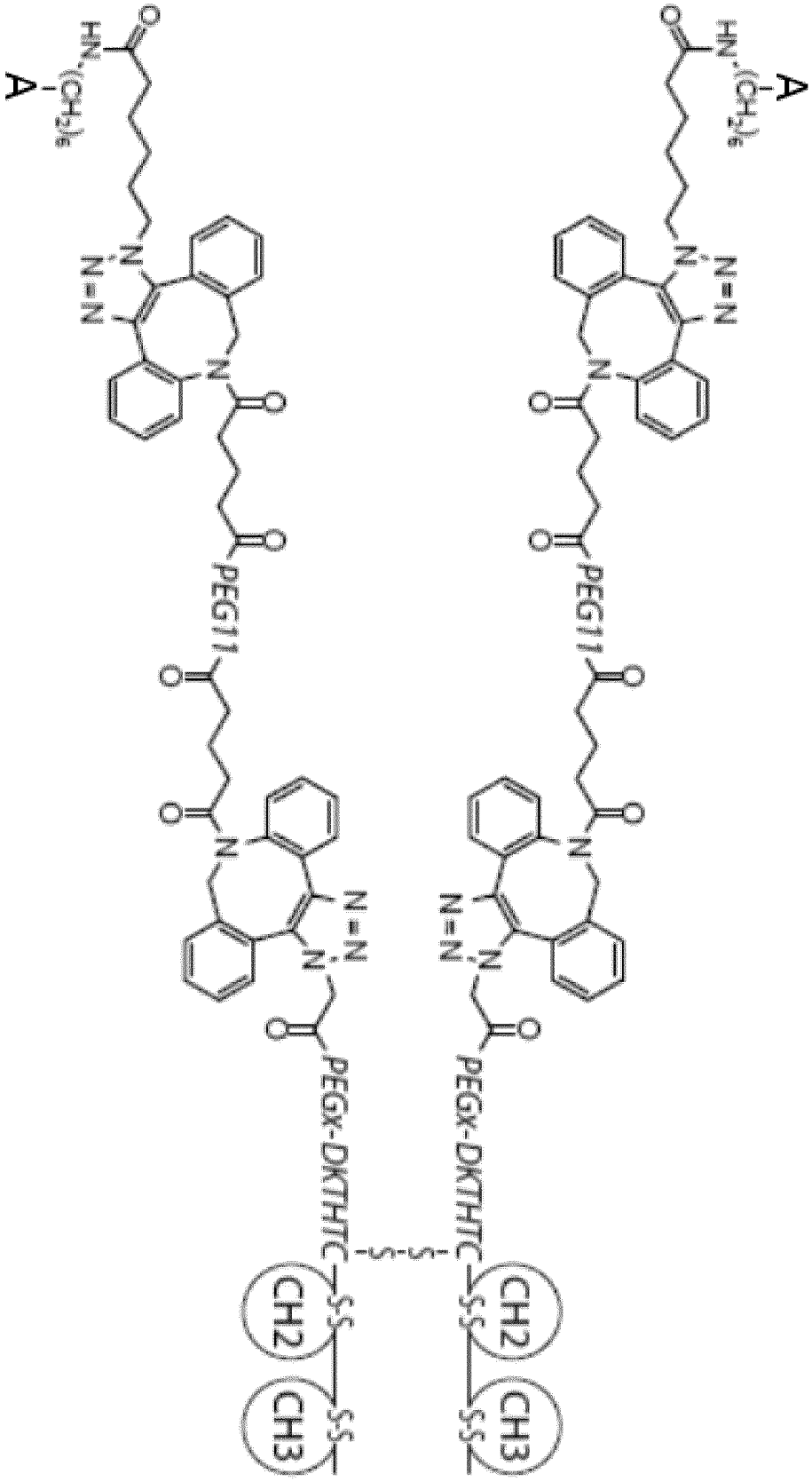

SH
A
N
H
N=N
O
4
DKTHTC
CH2
CH3
SS

;


A
A
PEGx-DKTHTC
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
CH2
CH3



; o



.

En las figuras se muestran ejemplos no limitativos adicionales de dímeros de compuestos de la presente invención.

En algunas realizaciones, el residuo ramificado es una lisina o un derivado de lisina, arginina o un derivado de arginina,

ácido aspártico o un derivado de ácido aspártico, ácido glutámico o un derivado de ácido glutámico, asparaginas o un derivado de asparaginas, glutamina o derivado de glutamina, tirosina o derivado de tirosina, cisteína o derivado de cisteína u ornitina o derivado de ornitina.

En algunas realizaciones, el residuo ramificado es un aminoácido sustituido en la posición N con un residuo que contiene un grupo reactivo amino o carbonilo terminal. En algunas realizaciones, el residuo ramificado es un residuo orgánico que contiene dos o más grupos amino terminales o dos o más grupos carbonilo terminales.

En algunas realizaciones, el residuo ramificado es un residuo orgánico que contiene dos o más grupos amino terminales. En algunas realizaciones, el residuo ramificado es un residuo orgánico que contiene dos o más grupos carbonilo terminales. En algunas realizaciones, el residuo ramificado es un ácido diaminopropiónico. En algunas realizaciones, el residuo ramificado es un compuesto de carbonilo diaminopropiónico.

En algunas realizaciones, el residuo ramificado es 4-(carbonilmetoxi)fenilalanina, ácido 2-amino-6-(carbonilmetilamino)hexanoico, S-(carbonilpropil)cisteína, S-(carboniletil)cisteína, S-(carbonilmetil)cisteína, N-(carboniletil)glicina, N-(carbonilmetil)glicina, ácido iminodipropiónico, ácido iminodiacético, ácido 4-amino-pimélico, ácido 4-aminoheptanodioico, ácido 3-aminohexanodioico, ácido 3-aminoadípico, ácido 2-aminooctanodioico o ácido 2-amino-6-carbonil-heptanodioico.

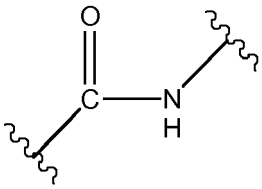
En algunas realizaciones, el residuo ramificado se prepara a partir de Fmoc-L-Asp-AMC, Fmoc-L-Asp-pNA, Fmoc-L-Glu-AMC, Fmoc-L-Glu-pNA, Fmoc-L-Glu(Edans)-OH, Fmoc-L-Glu(PEG-biotinil)-OH, éster 6-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-hexanodioico, éster 6-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-adípico, (S)-Fmoc-Aad(OtBu)-OH, éster 6-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-5-terc-butoxicarbonil-hexanodioico, éster 7-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-heptanodioico, éster 7-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-pimélico, éster 7-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-6-terc-butoxicarbonil-heptanodioico, éster 8-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-octanodioico, éster 8-terc-butílico del ácido (S)-Fmoc-2-amino-subérico, (S)-Fmoc-Asu(OtBu)-OH, éster 1-terc-butílico del ácido (R)-Fmoc-3-amino-hexanodioico, éster 1-terc-butílico del ácido (R)-Fmoc-3-amino-adípico, éster 1-terc-butílico del ácido (R)-Fmoc-4-amino-heptanodioico, éster 1-terc-butílico del ácido (R)-Fmoc-4-amino-pimélico, ácido Boc-iminodiacético, ácido Fmoc-iminodiacético, ácido Boc-iminodipropiónico, ácido Fmoc-iminodipropiónico, Fmoc-N-(terc-butoxicarbonilmetil)-glicina, Fmoc-N-(terc-butoxicarboniletil)-glicina, ácido (R)-Fmoc-2-amino-3-(terc-butoxicarbonilmetilsulfanil)-propiónico de Fmoc-L-Cys(terc-butoxicarbonilmetil)-OH, ácido (R)-Fmoc-2-amino-3-(3-terc-butoxicarbonilpropilsulfanil)-propiónico de Fmoc-L-Cys(terc-butoxicarbonilpropil)-OH, ácido (R)-Fmoc-2-amino-3-(2-terc-butoxicarboniletilsulfanil)-propiónico de Fmoc-L-Cys(terc-butoxicarboniletil)-OH, Fmoc-4-(terc-butoxicarbonilmetoxi)-L-fenilalanina o ácido (S)-Fmoc-2-amino-6-(Boc-terc-butoxicarbonilmetilamino)-hexanoico.

En algunas realizaciones, el residuo ramificado se prepara a partir de ácido N-α-Boc-DL-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-D-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Fmoc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-N-β-Alloc-D-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-N-β-Alloc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Fmoc-N-β-alloc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-N-β-Bis-Boc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Fmoc-N-β-Boc-D-diaminopropiónico, ácido N-α-Fmoc-N-β-Boc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Z-N-β-Boc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-N-β-Fmoc-D-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-N-β-Fmoc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-N-β-Bis-Fmoc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Z-N-β-Fmoc-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-N-β-Z-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Fmoc-N-β-Z-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Fmoc-N-β-(Boc-aminooxiacetil)-L-diaminopropiónico, ácido N-α-Boc-N-gamma-Fmoc-D-diaminobutírico, ácido N-α-Boc-N-gamma-Fmoc-L-diaminobutírico, ácido N-α-Boc-N-gamma-Fmoc-L-diaminobutírico, ácido N-α-Fmoc-N-gamma-Boc-D-diaminobutírico, ácido N-α-Fmoc-N-gamma-Boc-L-diaminobutírico, ácido N-α-Fmoc-N-gamma-Alloc-L-diaminobutírico, ácido (S)-N-b-Fmoc-N-gamma-Boc-3,4-diaminobutírico, H-L-ornitina, N-a-Boc-N-delta-Alloc-L-ornitina, N-a-Fmoc-N-delta-Alloc-L-ornitina, N-a-Fmoc-N-delta-Boc-L-ornitina, ácido (S)-Boc-2-amino-5-azido-pentanoico·DCHA, ácido (S)-Fmoc-2-amino-5-azido-pentanoico, N-a-N-delta-bis-Boc-N-a-N-delta-bis(3-Boc-aminopropil)-L-ornitina, N-a-Boc-N-β-N-delta-N-delta-tris(3-Boc-aminopropil)-L-ornitina, Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH, Fmoc-L-Lys(Dabcil)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)(Me)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)(iPr)-OH, ácido (2S,5R)-Fmoc-2-amino-4-(3-Boc-2,2-dimetil-oxazolidin-5-il)-butírico, ácido (S)-Fmoc-2-amino-6-(Boc-terc-butoxicarbonilmetil-amino)-hexanoico, ácido (S)-Fmoc-2-amino-7-(Boc-amino)-heptanoico, Fmoc-L-Arg(Me)(Pbf)-OH, Fmoc-L-Arg(Me)2(Pbf)-OH, Fmoc-L-Arg(Me)2-OH, ácido (S)-Fmoc-3-amino-5-[(N'-Pbf-pirrolidin-1-carboximidoil)-amino]-pentanoico, Fmoc-L-Homoarg(Et)2-OH, ácido Boc-3-amino-5-(Fmoc-amino)-benzoico, ácido 3,5-bis[2-(Boc-amino)etoxi]-benzoico, Fmoc-4-[2-(Boc-amino)etoxi]-L-fenilalanina, hemisulfato de potasio y N,N-bis(N'-Fmoc-3-aminopropil)-glicina, hemisulfato de potasio y N,N-bis(N'-Fmoc-3-aminopropil)-glicina, Fmoc-N-(2-Boc-aminoetil)-glicina, Fmoc-N-(3-Boc-aminopropil)-glicina, Fmoc-N-(4-Boc-aminobutil)-glicina, ácido (R,S)-N-α-Fmoc-N-a'-Boc-diaminoacético, ácido N,N'-bis-Fmoc-diaminoacético, ácido (S)-N-4-Fmoc-N-8-Boc-diaminooctanoico, ácido (R,S)-N-Fmoc-N'-Boc-imidazolidin-2-carboxílico, Fmoc-p(NH-Boc)-L-Phe-OH, Boc-p(NH-Fmoc)-L-Phe-OH o Boc-p(NH-Z)-L-Phe-OH.

Se entiende que, cuando se proporciona un intervalo de parámetros, todos los números enteros dentro de ese intervalo, y decimales de los mismos, también se proporcionan por la invención. Por ejemplo, "0,2-5 mg/kg/día" es una divulgación de 0,2 mg/kg/día, 0,3 mg/kg/día, 0,4 mg/kg/día, 0,5 mg/kg/día, 0,6 mg/kg/día, etc., hasta 5,0 mg/kg/día.

Términos

Tal como se usan en el presente documento, y a menos que se mencione lo contrario, cada uno de los siguientes términos tendrá la definición expuesta a continuación.

Unión peptidilo: la estructura  . Una unión peptidilo puede ser un enlace peptídico.

Tramo de aminoácidos consecutivos: una pluralidad de aminoácidos dispuestos en una cadena, cada uno de los cuales está unido a un aminoácido precedente mediante un enlace peptídico, excepto porque el primer aminoácido en la cadena puede opcionalmente no estar unido a un aminoácido precedente. Los aminoácidos de la cadena pueden producirse de manera natural o no producirse de manera natural, o pueden comprender una mezcla de los mismos. Los aminoácidos, a menos que se indique lo contrario, pueden codificarse genéticamente, producirse de manera natural pero no codificarse genéticamente o no producirse de manera natural, y cualquier selección de los mismos.

Residuo de aminoácido N-terminal: el residuo terminal de un tramo de dos o más aminoácidos consecutivos que tiene un grupo funcional α-amino (NH_2) libre, o un derivado de un grupo funcional α-amino (NH_2).

Extremo N-terminal: el grupo α-amino (NH_2) libre (o derivado del mismo) de un residuo de aminoácido N-terminal.

Residuo de aminoácido C-terminal: el residuo terminal de un tramo de dos o más aminoácidos consecutivos que tiene un grupo funcional α-carboxilo (COOH) libre, o un derivado de un grupo funcional α-carboxilo (COOH).

Extremo C-terminal: el grupo α-carboxilo (COOH) libre (o derivado del mismo) de un residuo de aminoácido C-terminal.

Una “estructura biológicamente activa”, tal como se usa en el presente documento, significa una estructura de una molécula o fragmento de la misma, que puede tratar una enfermedad o estado o localizar o dirigir un compuesto de la invención a un sitio de una enfermedad o estado en el organismo realizando una función o una acción, o estimulando o respondiendo a una función, una acción o una reacción, en un contexto biológico (por ejemplo en un organismo, una célula o un modelo *in vitro* de los mismos). Las estructuras biológicamente activas pueden comprender una estructura de al menos uno de polipéptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas tales como moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas.

Se entiende que un “enlace”, a menos que se especifique lo contrario, o sea contrario al contexto, incluye un enlace covalente, una interacción dipolo-dipolo tal como un enlace de hidrógeno, e interacciones intermoleculares tales como fuerzas de van der Waals.

Una “secuencia señal” es una cadena peptídica corta (de 3-60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte postraduccional de un polipéptido.

“Aminoácido” tal como se usa en el presente documento, en una realización, significa un isómero L o D de los aminoácidos codificados genéticamente, es decir isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, aspartato, metionina, cisteína, fenilalanina, glutamato, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, arginina, serina, histidina, tirosina, selenocisteína, pirrolisina y también incluye homocisteína y homoselenocisteína.

Otros ejemplos de aminoácidos incluyen un isómero L o D de taurina, gaba, dopamina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina, ornitina y citrulina, así como homólogos no naturales y formas sintéticamente modificadas de los mismos incluyendo aminoácidos que tienen cadenas de alquileno acortadas o alargadas en hasta dos átomos de carbono, aminoácidos que comprenden grupos arilo opcionalmente sustituidos, y aminoácidos que comprenden grupos halogenados, incluyendo grupos alquilo y arilo halogenados, así como beta o gamma-aminoácidos, y análogos cíclicos.

Debido a la presencia de grupos amino y carboxilo ionizables, los aminoácidos en estas realizaciones pueden estar en forma de sales ácidas o básicas, o pueden estar en formas neutras. También pueden modificarse residuos de aminoácido individuales mediante oxidación o reducción. Otras modificaciones contempladas incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, y metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina.

Pueden prepararse derivados covalentes uniendo grupos funcionales particulares a las cadenas laterales de aminoácido o a los extremos N o C-terminales.

Los compuestos que comprenden aminoácidos con sustituciones de grupo R están dentro del alcance de la invención. Se entiende que un experto habitual en la técnica puede seleccionar sustituyentes y patrones de sustitución en los compuestos de la presente invención para proporcionar compuestos que son químicamente estables a partir de materiales de partida fácilmente disponibles.

“Aminoácido natural” tal como se usa en el presente documento significa un isómero L o D de los aminoácidos genéticamente codificados, es decir isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, aspartato, metionina, cisteína, fenilalanina, glutamato, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, arginina, serina, histidina, tirosina, selenocisteína, pirrolisina y homocisteína y homoselenocisteína.

“Aminoácido no natural” tal como se usa en el presente documento significa un isómero L o D químicamente modificado de isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, aspartato, metionina, cisteína, fenilalanina, glutamato, treonina, glutamina, triptófano, glicina, valina, prolina, arginina, serina, histidina, tirosina, selenocisteína, pirrolisina, homocisteína, homoselenocisteína, taurina, gaba, dopamina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina, ornitina o citrulina, incluyendo derivados de cisteína y selenocisteína que tienen cadenas laterales alifáticas C_3-C_{10} entre el carbono alfa y el S o Se. En una realización, la cadena lateral alifática es un alquileno. En otra realización, la cadena lateral alifática es un alquenileno o alquinileno.

Además de los tramos de secuencias de aminoácidos consecutivos descritos en el presente documento, se contempla que pueden prepararse variantes de los mismos introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante y/o mediante síntesis de las secuencias de aminoácidos consecutivos deseadas. Los expertos en la técnica apreciarán que cambios de aminoácidos pueden alterar procesos postraduccionales de los tramos de aminoácidos consecutivos descritos en el presente documento cuando la expresión es el método de síntesis elegido (en vez de la síntesis química, por ejemplo), tal como cambiar el número o la posición de sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje a membrana.

Pueden realizarse variaciones en las secuencias descritas en el presente documento, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y orientaciones para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, deleción o inserción de uno o más codones que codifican para la secuencia de aminoácidos consecutivos de interés que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios. Puede encontrarse orientación en la determinación de qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o delecionarse sin afectar de manera adversa a la actividad deseada, comparando la secuencia con la de moléculas de proteína conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencia de aminoácidos en regiones de alta homología. Pueden obtenerse sustituciones de aminoácido como resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácido conservativas. Las inserciones o deleciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando sistémicamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y sometiendo a prueba las variantes resultantes para determinar la actividad mostrada por la secuencia nativa madura o de longitud completa. Se entiende que cualquier variación terminal se realiza dentro del contexto de la invención dada a conocer en el presente documento.

Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos de la pareja de unión teniendo en cuenta diversos objetivos, incluyendo aumentar la afinidad de la pareja de unión por su ligando, facilitar la estabilidad, purificación y preparación de la pareja de unión, modificar su semivida en plasma, mejorar la eficacia terapéutica y reducir la gravedad o aparición de efectos secundarios durante el uso terapéutico de la pareja de unión.

También se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de estas secuencias en el presente documento, incluyendo variantes de inserción, sustitución o deleción. Tales variantes pueden prepararse habitualmente mediante mutagénesis específica del sitio de nucleótidos en el ADN que codifica para el monómero de unión a diana, mediante lo cual se obtiene ADN que codifica para la variante, y después de eso expresando el ADN en cultivo de células recombinantes. También pueden prepararse de manera conveniente fragmentos que tienen hasta aproximadamente 100-150 residuos de aminoácido mediante síntesis *in vitro*. Tales variantes de secuencia de aminoácidos son variantes predeterminadas y no se encuentran en la naturaleza. Las variantes muestran la actividad biológica cualitativa (incluyendo unión a diana) de la forma no variante, aunque no necesariamente del mismo valor cuantitativo. Aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la mutación en sí misma no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, con el fin de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo mutagénesis al azar o por saturación (en la que se insertan los 20 residuos posibles) en el codón objetivo y se examina la variante expresada para determinar la combinación óptima de actividades deseadas. Tal examen está dentro de la experiencia habitual en la técnica.

Las inserciones de aminoácido serán habitualmente del orden de aproximadamente desde 1 hasta 10 residuos de aminoácido; normalmente se introducen sustituciones para residuos individuales; y las deleciones oscilarán aproximadamente entre 1 y 30 residuos. Preferiblemente se realizan deleciones o inserciones en pares adyacentes, es decir una deleción de 2 residuos o inserción de 2 residuos. Resultará ampliamente evidente a partir de la siguiente discusión que se introducen o se combinan sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a un producto final.

En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto que comprende un tramo de aminoácidos consecutivos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente identidad de secuencia de

al menos aproximadamente el 81%, más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 82%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 83%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 84%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 86%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 87%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 88%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 89%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 90%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 91%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 92%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 93%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 94%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 95%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 96%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 97%, aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 98% y aún más preferiblemente identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 99% con respecto a una secuencia de aminoácidos dada a conocer en la memoria descriptiva, una figura, una SEQ ID NO. o una lista de secuencias de la presente solicitud.

Los valores de identidad de secuencia de aminoácidos en % pueden obtenerse fácilmente usando, por ejemplo, el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)).

En el presente documento se proporcionan fragmentos de secuencias nativas. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, en comparación con una proteína nativa de longitud completa. De nuevo, se entiende que cualquier variación terminal se realiza dentro del contexto de la invención dada a conocer en el presente documento.

Determinados fragmentos carecen de residuos de aminoácido que no son esenciales para una actividad biológica deseada de la secuencia de interés.

Puede usarse cualquiera de varias técnicas convencionales. Pueden sintetizarse químicamente fragmentos de péptidos deseados o fragmentos de tramos de aminoácidos consecutivos. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos mediante digestión enzimática, por ejemplo tratando la proteína con una enzima que se sabe que escinde proteínas en sitios definidos mediante residuos de aminoácido particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada implica asilar y amplificar un fragmento de ADN que codifica para un fragmento de polipéptido/secuencia deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Oligonucleótidos que definen los extremos terminales deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5’ y 3’ en la PCR.

En realizaciones particulares, sustituciones conservativas de interés se muestran en la tabla 1 bajo el título de sustituciones preferidas. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la tabla 1, o tal como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se examinan los productos.

TABLA 1

Original	A modo de ejemplo	Preferida
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se logran modificaciones sustanciales en cuanto a la función o la identidad inmunológica de la secuencia seleccionando sustituciones que difieren significativamente en cuanto a su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal de polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como conformación en láminas o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio objetivo o (c) el volumen ocupado de la cadena lateral. Los residuos que se producen de manera natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro;

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse también en los sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones pueden realizarse usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida al sitio), barrido de alanina y mutagénesis por PCR. Puede realizarse mutagénesis dirigida al sitio (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), mutagénesis en casete (Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)), mutagénesis por selección de restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)) u otras técnicas conocidas en el ADN clonado para producir el ADN variante.

También puede emplearse análisis de aminoácidos por barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos se encuentran los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de cadena principal de la variante (Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)). También se prefiere normalmente alanina porque es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)). Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

Modificaciones covalentes: El tramo de aminoácidos consecutivos puede modificarse de manera covalente. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos de aminoácido seleccionados como diana con un agente

de derivatización orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C-terminales que no participan en un enlace -x-x-. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para la reticulación con una superficie o matriz de soporte insoluble en agua para su uso en el método para purificar anticuerpos anti-secuencia de interés, y viceversa. Los agentes de reticulación habitualmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como 3-((p-azidofenil)ditio)propioimidato de metilo.

Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo para dar los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del tramo de aminoácidos consecutivos. Para los fines en el presente documento, se pretende que "alterar el patrón de glicosilación nativo" signifique delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en secuencias de aminoácidos (o bien retirando el sitio de glicosilación subyacente o bien delecionando la glicosilación mediante medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos de hidratos de carbono presentes.

La adición de sitios de glicosilación a la secuencia de aminoácidos puede lograrse alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos puede alterarse opcionalmente mediante cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos en bases preseleccionadas de tal manera que se generan codones que se traducirán para dar los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de restos de hidratos de carbono en la secuencia de aminoácidos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

La retirada de restos de hidratos de carbono presentes en la secuencia de aminoácidos puede lograrse de manera química o enzimática o mediante sustitución por mutación de codones que codifican para residuos de aminoácido que sirven como dianas para la glicosilación. En la técnica se conocen técnicas de desglicosilación químicas y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en polipéptidos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo y exo-glicosidasas tal como se describe por Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente comprende unir la secuencia de aminoácidos a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes estadounidenses n.os 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

El término "sustitución", "sustituido" y "sustituyente" se refiere a un grupo funcional en el que uno o más enlaces a un átomo de hidrógeno contenidos en el mismo se sustituyen por un enlace a átomos distintos de hidrógeno, siempre que se mantengan las valencias normales y que la sustitución de cómo resultado un compuesto estable. Los grupos sustituidos también incluyen grupos en los que uno o más enlaces a un(os) átomo(s) de carbono o hidrógeno se sustituyen por uno o más enlaces, incluyendo dobles o triples enlaces, a un heteroátomo. Los ejemplos de grupos sustituyentes incluyen halógenos (es decir, F, Cl, Br e I); grupos alquilo, tales como metilo, etilo, n-propilo, isoproprilo, n-butilo, terc-butilo y trifluorometilo; grupos arilo, tales como fenilo; grupos heteroarilo, tales como triazol, dihidropiridazina y tetrazol; hidroxilo; grupos alcoxilo, tales como metoxilo, etoxilo, n-propoxilo e isopropoxilo; grupos ariloxilo, tales como fenoxilo; arilalquiloxilo, tal como benciloxilo (fenilmetoxilo) y p-trifluorometilbenciloxilo (4-trifluorometilfenilmetoxilo); grupos heteroariloxilo; grupos sulfonilo, tales como sulfonato, trifluorometanosulfonilo, metanosulfonilo y p-toluenosulfonilo; sulfonitro, nitrosilo; mercapto; grupos sulfanilo, tales como metilsulfanilo, etilsulfanilo y propilsulfanilo; ciano; grupos amino, tales como amino, metilamino, dimetilamino, etilamino y dietilamino; y carboxilo. Cuando se dan a conocer o se reivindican múltiples restos sustituyentes, el compuesto sustituido puede estar sustituido independientemente con uno o más de los restos sustituyentes dados a conocer o reivindicados, de manera individual o múltiple. Por independientemente sustituido, quiere decirse que los (dos o más) sustituyentes pueden ser iguales o diferentes. En los compuestos usados en el método de la presente invención, pueden sustituirse grupos alquilo, heteroalquilo, monociclo, biciclo, arilo, heteroarilo y heterociclo remplazando uno o más átomos de hidrógeno por grupos distintos de hidrógeno alternativos. Estos incluyen, pero no se limitan a, halo, hidroxilo, mercapto, amino, carboxilo, ciano y carbamoilo.

Se entiende que un experto habitual en la técnica puede seleccionar sustituyentes y patrones de sustitución en los compuestos usados en el método de la presente invención para proporcionar compuestos que son químicamente estables y que pueden sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Si un sustituyente está a su vez sustituido con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar en el mismo carbono o en carbonos diferentes, siempre que se obtenga como resultado una estructura estable.

Al elegir los compuestos usados en el método de la presente invención, un experto habitual en la técnica reconocerá que los diversos sustituyentes, es decir R_1, R_2, etc., deben elegirse de acuerdo con principios bien conocidos de la conectividad de estructuras químicas.

Tal como se usa en el presente documento, “alquilo” incluye grupos de hidrocarburos alifáticos saturados de cadena tanto ramificada como lineal que tienen el número especificado de átomos de carbono y pueden no estar sustituidos o estar sustituidos. Por tanto, se define que C_1-C_n tal como en “alquilo C_1-C_n” incluye grupos que tienen 1, 2,...., n-1 o n carbonos en una disposición lineal o ramificada. Por ejemplo, se define que C_1-C_6, tal como en “alquilo C_1-C_6” incluye grupos que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos en una disposición lineal o ramificada, e incluye específicamente metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, pentilo y hexilo. A menos que se especifique lo contrario, contiene de uno a doce carbonos. Los grupos alquilo también pueden no estar sustituidos o estar sustituidos con uno o más sustituyentes, incluyendo, pero sin limitarse a, halógeno, alcoxilo, alquiltio, trifluorometilo, difluorometilo, metoxilo e hidroxilo. Una realización puede ser alquilo C_1-C_{12}, alquilo C_2-C_{12}, alquilo C_3-C_{12}, alquilo C_4-C_{12} y así sucesivamente. Una realización puede ser alquilo C_1-C_8, alquilo C_2-C_8, alquilo C_3-C_8, alquilo C_4-C_8 y así sucesivamente. Se pretende que alquilo incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

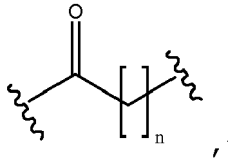
Tal como se usa en el presente documento, “alquilo C_1-C_4” incluye alquilo C_1-C_4 de cadena tanto ramificada como lineal.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cicloalcano” se refiere a un sistema de anillos monocíclico o bicíclico, que puede estar insaturado o parcialmente insaturado, es decir presenta uno o más dobles enlaces. Los sistemas de anillos monocíclicos se muestran a modo de ejemplo mediante un grupo de hidrocarburo cíclico saturado que contiene desde 3 hasta 8 átomos de carbono. Los ejemplos de sistemas de anillos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los sistemas de anillos condensados bicíclicos se muestran a modo de ejemplo mediante un anillo cicloalquilo condensado a otro anillo cicloalquilo. Los ejemplos de sistemas de anillos condensados bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, decalina, 1,2,3,7,8,8a-hexahidro-naftaleno y similares. Por tanto, cicloalcano C_3-C_{10} incluye anillos cíclicos de alcanos de tres a ocho átomos de carbono en total (por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo y así sucesivamente). Los grupos cicloalcano pueden no estar sustituidos o estar sustituidos con uno o más sustituyentes, incluyendo, pero sin limitarse a, halógeno, alcoxilo, alquiltio, trifluorometilo, difluorometilo, metoxilo e hidroxilo. Se pretende que cicloalcano incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cicloalqueno” se refiere a un cicloalcano que presenta uno o más dobles enlaces. Por tanto, cicloalqueno C_5-C_{10} incluye anillos cíclicos de alcanos de cinco a diez átomos de carbono totales (por ejemplo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclohexadienilo, ciclooctenilo o ciclooctadienilo y así sucesivamente). Cicloalqueno se refiere a restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc. Se pretende que cicloalqueno incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Tal como se usa en el presente documento, “alqueno” incluye grupos de hidrocarburos alifáticos de cadena tanto ramificada como lineal que tienen uno o más dobles enlaces y el número especificado de átomos de carbono y pueden no estar sustituidos o estar sustituidos. Por tanto, se define que C_2-C_n tal como en “alqueno C_2-C_n” incluye grupos que tienen 2, 3,...., n-1 o n carbonos en una disposición lineal o ramificada. Por ejemplo, se define que C_2-C_{10}, tal como en “alqueno C_2-C_{10}” incluye grupos que tienen 2, 3, 4, 5...10 carbonos en una disposición lineal o ramificada, e incluye específicamente vinilo, alilo, 1-buteno, 2-buteno, isobuteno, 1-penteno, 2-penteno, etc. Los grupos alqueno pueden no estar sustituidos o estar sustituidos con uno o más sustituyentes, incluyendo, pero sin limitarse a, halógeno, alcoxilo, alquiltio, trifluorometilo, difluorometilo, metoxilo e hidroxilo. Una realización puede ser alqueno C_2-C_3, alqueno C_2-C_4, alqueno C_2-C_5 y así sucesivamente. Se pretende que alqueno incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Tal como se usa en el presente documento, un “acilo” se refiere a un grupo alquilo que tiene una cetona en la primera posición. Por ejemplo, una realización de “acilo” puede ser acetilo, propionilo, butirilo y valerilo. Como otro ejemplo, una realización de “acilo” puede ser:



en el que n es 1-10. En otra realización, n es 1-4.

Por tanto, un “acilo C_2-C_5” puede ser acetilo, propionilo, butirilo y/o valerilo. Se pretende que acilo incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Acilamino C_2-C_5 es un grupo acilo tal como se definió anteriormente sustituido adicionalmente con una amina. La amina puede estar unida a la porción de carbonilo del grupo acilo para formar una amida o la amina puede estar unida a una porción distinta de carbonilo del grupo acilo. Por ejemplo, el grupo amino puede estar en la posición alfa, la posición beta, la posición gamma, la posición delta, etc. Como ejemplos adicionales, acilamino incluye grupos tanto alfa-aminoacetilo como acetamido. Acilamino incluye beta-(aminopropionilo).

Aciloxilo C_2-C_5 es un grupo acilo tal como se definió anteriormente sustituido adicionalmente con un oxígeno. El oxígeno puede estar unido a la porción de carbonilo del grupo acilo para formar una amida o el oxígeno puede estar unido a una porción distinta de carbonilo del grupo acilo. Por ejemplo, el grupo de oxígeno puede estar en la posición alfa, la posición beta, la posición gamma, la posición delta, etc. Como ejemplos adicionales, aciloxilo incluye grupos tanto alfa-oxiacetilo como acetato. Aciloxilo incluye beta-(oxipropionilo).

Tal como se usa en el presente documento, “amino” incluye aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias. Por tanto, amino incluye un grupo -NH-, un grupo $-NH_2$, un grupo -NR-, un grupo $-NR_2^+$-, un grupo $-NRH^+$-, un grupo $-NH_2^+$-, un grupo $-NH_3^+$ y un grupo $-NR_3^+$, en el que R es alquilo o arilo. Se pretende que amino incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Tal como se usa en el presente documento, “azufre” incluye un grupo -S- y un grupo -SH. Se pretende que el término azufre incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Tal como se usa en el presente documento, “oxígeno” incluye un grupo -O- y un grupo -OH. El término azufre se refiere a restos que son monovalentes y divalentes.

Tal como se usa en el presente documento, “succinilo” se deriva de ácido succínico mediante retirada de uno o ambos grupos hidroxilo. Una realización puede ser $-C(O)-CH_2-CH_2-C(O)-$. Se pretende que succinilo incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

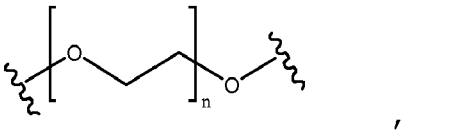
Tal como se usa en el presente documento, un “malonilo” se deriva de ácido malónico mediante retirada de uno o ambos grupos hidroxilo. Una realización puede ser $-C(O)-CH_2-C(O)-$. Se pretende que malonilo incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

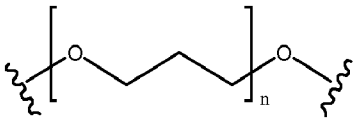
Tal como se usa en el presente documento, un “glutarilo” se deriva de ácido glutárico mediante retirada de uno o ambos grupos hidroxilo. Una realización puede ser $-C(O)-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-$. Se pretende que glutarilo incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Tal como se usa en el presente documento, un “adipoilo” se deriva de ácido adípico mediante retirada de uno o ambos grupos hidroxilo. Una realización puede ser $-C(O)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-(O)-$. Se pretende que adipoilo incluya restos que son monovalentes, divalentes, trivalentes, etc.

Un “polialquilenglicol” se deriva de polialquilenglicol mediante retirada de ambos hidrógenos a partir de los grupos hidroxilo. Una realización puede derivarse de polietilenglicol, polipropilenglicol o polibutilenglicol.

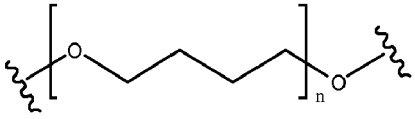
Una realización de “polialquilenglicol” puede ser



,


,

o



,

en el que n es 1-10.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que “arilo” signifique cualquier anillo de carbono monocíclico, bicíclico o policíclico estable de hasta 10 átomos en cada anillo, en el que al menos un anillo es aromático, y puede no estar sustituido o estar sustituido. Los ejemplos de tales elementos de arilo incluyen, pero no se limitan a: fenilo, p-toluenilo (4-metilfenilo), naftilo, tetrahidro-naftilo, indanilo, fenantrilo, antrilo o acenaftilo. En casos en los que el sustituyente de arilo es bicíclico y un anillo no es aromático, se entiende que la unión se realiza mediante el anillo aromático.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que “arilo” signifique cualquier anillo de carbono monocíclico,

bicíclico o policíclico estable de hasta 10 átomos en cada anillo, en el que al menos un anillo es aromático, y puede no estar sustituido o estar sustituido. Los ejemplos de tales elementos de arilo incluyen, pero no se limitan a: fenilo, p-toluenilo (4-metilfenilo), naftilo, tetrahidro-naftilo, indanilo, fenantrilo, antrilo o acenaftilo. En casos en los que el sustituyente de arilo es bicíclico y un anillo no es aromático, se entiende que la unión se realiza mediante el anillo aromático.

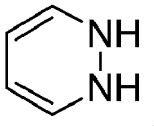
El término “heteroarilo”, tal como se usa en el presente documento, representa un anillo monocíclico, bicíclico o policíclico estable de hasta 10 átomos en cada anillo, en el que al menos un anillo es aromático y contiene desde 1 hasta 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S. Los grupos heteroarilo aromáticos bicíclicos incluyen anillos de fenilo, piridina, pirimidina o piridizina que están (a) condensados a un anillo heterocíclico aromático (insaturado) de 6 miembros que tiene un átomo de nitrógeno; (b) condensados a un anillo heterocíclico aromático (insaturado) de 5 o 6 miembros que tiene dos átomos de nitrógeno; (c) condensados a un anillo heterocíclico aromático (insaturado) de 5 miembros que tiene un átomo de nitrógeno junto con un átomo o bien de oxígeno o bien de azufre; o (d) condensados a un anillo heterocíclico aromático (insaturado) de 5 miembros que tiene un heteroátomo seleccionado de O, N o S. Los grupos heteroarilo dentro del alcance de esta definición incluyen, pero no se limitan a: benzoimidazolilo, benzofuranilo, benzofurazanilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cinolinilo, dihidropiridizina, furanilo, indolinilo, indolilo, indolazinilo, indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftopiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, oxazolina, isoxazolina, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridazinilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, azetidinilo, aziridinilo, 1,4-dioxanilo, hexahidroazepinilo, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisooxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihidroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrotienilo, dihidrotriazolilo, dihidroazetidinilo, metilendioxibenzoilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, acridinilo, carbazolilo, cinolinilo, quinoxalinilo, pirrazolilo, indolilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, furanilo, tienilo, benzotienilo, benzofuranilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isoxazolilo, indolilo, pirazinilo, piridazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolilo, tetra-hidroquinolina. En casos en los que el sustituyente de heteroarilo es bicíclico y un anillo no es aromático o no contiene ningún heteroátomo, se entiende que la unión se realiza mediante el anillo aromático o mediante el anillo que contiene heteroátomo, respectivamente. Si el heteroarilo contiene átomos de nitrógeno, se entiende que los N-óxidos correspondientes del mismo también quedan abarcados por esta definición.

Se pretende que el término “fenilo” signifique un anillo aromático de seis miembros que contiene seis carbonos, y cualquier derivado sustituido del mismo.

Se pretende que el término “bencilo” signifique un metileno unido directamente a un anillo de benceno. Un grupo bencilo es un grupo metilo en el que un hidrógeno está sustituido por un grupo fenilo, y cualquier derivado sustituido del mismo.

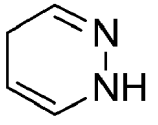
Se pretende que el término “triazol” signifique un heteroarilo que tiene un anillo de cinco miembros que contiene dos átomos de carbono y tres átomos de nitrógeno, y cualquier derivado sustituido del mismo.

La dihidropiradizina está opcionalmente sustituida e incluye 1,2-dihidropiridazinas,



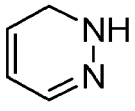
;

1,4-dihidropiridazinas,



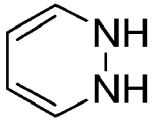
;

1,6-dihidropiridazinas,



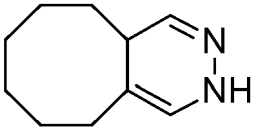
;

y 4,5-dihidropiridazinas,

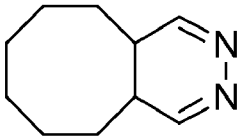


.

Una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina incluye, pero no se limita a, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a la 3ª y 4ª posición de una dihidropiridazina o una estructura química que contiene una ciclooct[d]piridazina saturada, cualquiera de las cuales está opcionalmente sustituida. Por ejemplo, la estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina incluye, pero no se limita a, una estructura química que contiene una 2,4a,5,6,7,8,9,10-octahidrociclooct[d]piridazina,

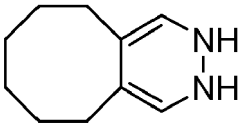


una 4a,5,6,7,8,9,10,10a-octahidrociclooct[d]piridazina,



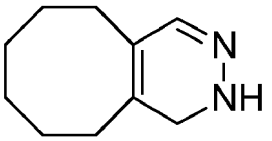
;

una 2,3,5,6,7,8,9,10-octahidrociclooct[d]piridazina,



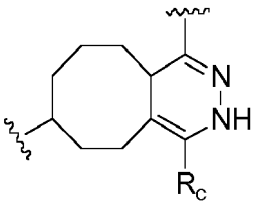
;

o una 1,2,5,6,7,8,9,10-octahidrociclooct[d]piridazina,

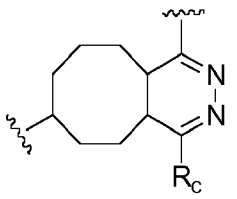


,

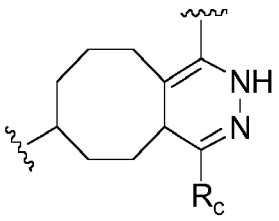
cada una de las cuales puede estar opcionalmente sustituida. Los tautómeros de



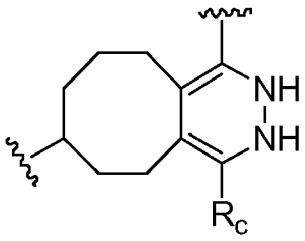
incluyen, pero no se limitan a:



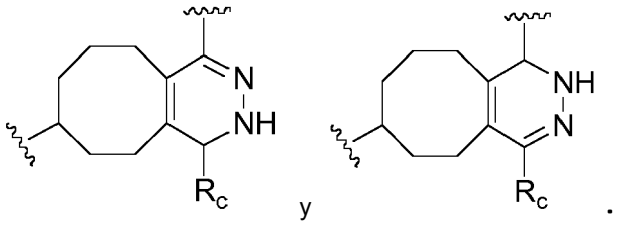
,



,



,



En algunas realizaciones, la dihidropiridazina se oxida para dar una piridazina.

En algunas realizaciones, la dihidropiridazina se reduce para dar como resultado una estructura de anillo abierto que tiene un compuesto de 1,4-dicarbonilo.

Los compuestos usados en el método de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas bien conocidas en la síntesis orgánica y con las que está familiarizado un experto habitual en la técnica. Sin embargo, estos pueden no ser los únicos medios mediante los cuales sintetizar u obtener los compuestos deseados.

Los compuestos preparados a partir de la invención objeto pueden convertirse en profármacos para optimizar la absorción y biodisponibilidad. La formación de un profármaco incluye, pero no se limita a, reacción de un grupo hidroxilo libre con un ácido carboxílico para formar un éster, reacción de un grupo hidroxilo libre con un oxicloruro de fósforo seguido por hidrólisis para formar un fosfato, o reacción de un grupo hidroxilo libre con un aminoácido para formar un éster de aminoácido, cuyo procedimiento se ha descrito previamente por Chandran en el documento WO 2005/046575. Los sustituyentes se eligen y los análogos resultantes se evalúan según principios bien conocidos en la técnica de la química medicinal y farmacéutica, tales como cuantificación de relaciones de estructura-actividad, optimización de actividad biológica y propiedades de ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad).

Los diversos grupos R unidos a los anillos aromáticos de los compuestos dados a conocer en el presente documento pueden añadirse a los anillos mediante procedimientos convencionales, por ejemplo los expuestos en Advanced Organic Chemistry: Part B: Reaction and Synthesis, Francis Carey y Richard Sundberg, (Springer) 5ª ed. edición (2007), cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia.

Los compuestos de presente invención pueden prepararse mediante técnicas descritas en Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, A.I. Vogel, A.R. Tatchell, B.S. Furnis, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith, (Prentice Hall) 5ª edición (1996), March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, Michael B. Smith, Jerry March, (Wiley-Interscience) 5ª edición (2007), y referencias en los mismos. Sin embargo, pueden no ser los únicos medios mediante los cuales sintetizar u obtener los compuestos deseados.

Un experto habitual en la técnica entenderá fácilmente que se pretende que las definiciones de los sustituyentes y restos (por ejemplo los restos de J, R_a y R_b) proporcionadas en el presente documento respeten las reglas convencionales de la valencia química. Por ejemplo, cuando una estructura proporcionada en el presente documento requiere que un sustituyente o resto particular sea divalente (por ejemplo un resto en una cadena lineal de restos), un experto habitual en la técnica entenderá fácilmente que las definiciones de ese sustituyente o resto son divalentes con el fin de respetar las reglas convencionales de la valencia química.

Un experto habitual en la técnica entenderá fácilmente que algunos restos divalentes representados en la presente invención pueden unirse a otras estructuras químicas de más de una manera, por ejemplo, las estructuras representadas pueden unirse a otras estructuras químicas cuando se rotan o se invierten.

En algunas realizaciones de la presente invención, un compuesto comprende un polímero no proteico. En algunas realizaciones, el polímero no proteico puede ser es un polímero sintético hidrófilo, es decir, un polímero no encontrado de otro modo en la naturaleza. Sin embargo, polímeros que existen en la naturaleza y se producen mediante métodos recombinantes o *in vitro* son útiles, al igual que polímeros que se aíslan a partir de la naturaleza. Los polímeros de polivinilo hidrófilos se encuentran dentro del alcance de esta invención, por ejemplo poli(alcohol vinílico) y polivinilpirrolidona. Son particularmente útiles los poli(éteres de alquileno) tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, ésteres de polioxietileno o metoxi-polietilenglicol; polioxialquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno y copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronics); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros de sacáridos D-manosa, D y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-ácido glucurónico, ácido siálico, D-ácido galacturónico, D-ácido manurónico (por ejemplo poli(ácido manurónico) o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico incluyendo homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como lactosa, amilopectina, almidón, hidroxietilalmidón, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glicógeno o la subunidad de polisacárido de mucopolisacáridos ácidos, por ejemplo ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar tales como polisorbitol y polimanitol; y heparina o Heparon.

Sales

Las sales de los compuestos dados a conocer en el presente documento están dentro del alcance de la invención. Tal como se usa en el presente documento, una “sal” es sal de los presentes compuestos que se han modificado produciendo sales de ácidos o bases de los compuestos.

Dominios Fc

El término “dominio Fc”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a un complejo de monómero o dímero, que comprende las secuencias de polipéptido C-terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio Fc puede comprender secuencias de Fc nativas o variantes. Aunque los límites del dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, habitualmente se define que el dominio Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un residuo de aminoácido en la región de bisagra hasta el extremo carboxilo-terminal de la secuencia de Fc. La secuencia de Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos regiones constantes, una región CH2 y una región CH3, y opcionalmente comprende una región CH4. Un dominio Fc humano puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina adecuada, tal como los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM.

Se preparan dominios Fc adecuados mediante expresión de ADN recombinante de polipéptidos quiméricos pre-Fc que comprenden 1) un péptido señal, obtenido a partir de una proteína secretada o transmembrana, que se escinde delante de un polipéptido maduro que tiene un residuo de cisteína N-terminal, contiguo con 2) un polipéptido de dominio Fc que tiene un residuo de cisteína N-terminal.

Ejemplos adecuados de péptidos señal son sonic hedgehog (SHH) (n.º de registro de GenBank NM000193), IFNalfa-2 (IFN) (n.º de registro de GenBank NP000596) y colesterol éster transferasa (CETP) (n.º de registro de GenBank NM000078). Otros ejemplos adecuados incluyen Indian hedgehog (n.º de registro de GenBank NM002181), desert hedgehog (n.º de registro de GenBank NM021044), IFNalfa-1 (n.º de registro de GenBank NP076918), IFNalfa-4 (n.º de registro de GenBank NM021068), IFNalfa-5 (n.º de registro de GenBank NM002169), IFNalfa-6 (n.º de registro de GenBank NM021002), IFNalfa-7 (n.º de registro de GenBank NM021057), IFNalfa-8 (n.º de registro de GenBank NM002170), IFNalfa-10 (n.º de registro de GenBank NM002171), IFNalfa-13 (n.º de registro de GenBank NM006900), IFNalfa-14 (n.º de registro de GenBank NM002172), IFNalfa-16 (n.º de registro de GenBank NM002173), IFNalfa-17 (n.º de registro de GenBank NM021268) e IFNalfa-21 (n.º de registro de GenBank NM002175).

Ejemplos adecuados de dominios Fc y sus polipéptidos quiméricos pre-Fc se muestran en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 96. Los dominios Fc se obtienen expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc en células en condiciones que conducen a su secreción y escisión del péptido señal. Los polipéptidos pre-Fc pueden expresarse en células huésped o bien procariotas o bien eucariotas. Preferiblemente, se transfectan células huésped de mamífero con vectores de expresión que codifican para los polipéptidos pre-Fc.

Dominios Fc de IgG1 humana que tienen la secuencia N-terminal CDKTHTCPPCPAPE, CPPCPAPE y CPAPE se muestran en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 17, respectivamente, y las secuencias de ADN que codifican para los mismos se muestran en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 18, respectivamente. El dominio de IgG1 de SEQ ID NO: 1 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 3 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 5 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 7 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, respectivamente. El dominio de IgG1 de SEQ ID NO: 9 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 11 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 13 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 15 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16, respectivamente. El dominio de IgG1 de SEQ ID NO: 17 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 19 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 21 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 23 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24, respectivamente.

Dominios Fc de IgG2 humana que tienen la secuencia N-terminal CCVECPPCPAPE, CVECPPCPAPE, CPPCPAPE, y CPAPE se muestran en SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 49, respectivamente, y las secuencias de ADN que codifican para los mismos se muestran en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 50, respectivamente. El dominio de IgG2 de SEQ ID NO: 25 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 27 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 29 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 31 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 32, respectivamente. El dominio de IgG2 de SEQ ID NO: 33 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 35 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 37 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 39 (péptido señal de CETP) usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40, respectivamente. El dominio de IgG2 de SEQ ID NO: 41 se obtiene a partir de los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 43 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 45 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 47 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 48, respectivamente. El dominio de IgG2 de SEQ ID NO: 49 se obtiene a partir de los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 51 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 53 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 55 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56, respectivamente.

Dominios Fc de IgG3 humana que tienen la secuencia N-terminal (CPRCPEPKSDTPPP)3-CPRCPAPE, CPRCPAPE y CPAPE se muestran en SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 73, respectivamente, y las secuencias de ADN que codifican para los mismos se muestran en SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 74, respectivamente. El dominio de IgG3 de SEQ ID NO: 57 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 59 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 61 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 63 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 64, respectivamente. El dominio de IgG3 de SEQ ID NO: 65 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 67 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 69 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 71 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 72, respectivamente. El dominio de IgG3 de SEQ ID NO: 73 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 75 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 77 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 79 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 80, respectivamente.

Las secuencias de dominios Fc de IgG4 humana que tienen la secuencia N-terminal CPSCPAPE y CPAPE se muestran en SEQ ID NO: 81 y SEQ ID NO: 89, respectivamente, y las secuencias de ADN que codifican para los mismos se muestran en SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 90, respectivamente. El dominio de IgG4 de SEQ ID NO: 81 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 83 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 85 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 87 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86 y SEQ ID NO: 88, respectivamente. El dominio de IgG4 de SEQ ID NO: 89 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-Fc mostrados en SEQ ID NO: 91 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 93 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 95 (péptido señal de CETP), usando las secuencias de ADN mostradas en SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94 y SEQ ID NO: 96, respectivamente.

Se preparan variantes de anticuerpos adecuados que tienen en su extremo N-terminal de cadena pesada un residuo de cisteína mediante expresión de ADN recombinante de polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada que comprenden 1) un péptido señal, obtenido a partir de una proteína secretada o transmembrana, que se escinde delante de un polipéptido maduro que tiene un residuo de cisteína N-terminal, contiguo con 2) un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo que tiene un residuo de cisteína N-terminal.

Se preparan variantes de anticuerpos adecuados que tienen en su extremo N-terminal de cadena ligera un residuo de cisteína mediante expresión de ADN recombinante de polipéptidos quiméricos pre-cadena ligera que comprenden 1) un péptido señal, obtenido a partir de una proteína secretada o transmembrana, que se escinde delante de un polipéptido maduro que tiene un residuo de cisteína N-terminal, contiguo con 2) un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo que tiene un residuo de cisteína N-terminal.

Se obtienen cadenas pesada y ligera de trastuzumab expresando los polipéptidos quiméricos pre-pesado y pre-ligero en células en condiciones que conducen a su secreción y escisión del péptido señal. Los polipéptidos pre-cadena pesada y pre-cadena ligera pueden expresarse en células huésped o bien procariotas o bien eucariotas. Preferiblemente, se transfectan células huésped de mamífero con vectores de expresión que codifican para los polipéptidos pre-cadena pesada y pre-cadena ligera.

En el presente documento se ilustran secuencias de proteína añadidas al extremo N-terminal de las variantes de cadena pesada, pre-cadena pesada, cadena ligera y pre-cadena ligera de anticuerpo anteriormente mencionadas para el anticuerpo recombinante trastuzumab, pero son aplicables de manera general a cualquier anticuerpo recombinante. Pueden construirse y expresarse secuencias de ADN que codifican para trastuzumab y sus variantes en células de mamífero cotransfectando vectores de ADN para sus cadenas pesada y ligera, y variantes derivadas de las mismas, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.821.337 (“Immunoglobulin Variants”). La secuencia de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de trastuzumab silvestres se muestran en SEQ ID NO: 128 y SEQ ID NO: 129, respectivamente.

Ejemplos adecuados de cadenas ligeras de trastuzumab con residuos de cisteína N-terminales y sus polipéptidos quiméricos pre-Fc se muestran en SEQ ID NO: 130 a SEQ ID NO: 165. Ejemplos adecuados de cadenas pesadas de trastuzumab con residuos de cisteína N-terminales y sus polipéptidos quiméricos pre-Fc se muestran en SEQ ID NO: 166 a SEQ ID NO: 201.

Cadenas ligeras de trastuzumab que tienen la secuencia N-terminal C, CP, CPP, CPR, CPS, CDKT, CDKTHT, CVE, y CDTPPP se muestran en SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 158 y SEQ ID NO: 162, respectivamente. La cadena ligera de SEQ ID NO: 130 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-ligeros mostrados en SEQ ID NO: 131 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 132 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 133 (péptido señal de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 134 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-cadena ligera mostrados en SEQ ID NO: 135 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 136 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 137 (péptido señal de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 138 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-ligeros mostrados en SEQ ID NO: 139 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 140 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 141 (péptido señal de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 142 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-ligeros mostrados en SEQ ID NO: 143 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 144 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 145 (péptido señal

de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 146 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-pesados ligeros mostrados en SEQ ID NO: 147 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 148 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 149 (péptido señal de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 150 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-ligeros mostrados en SEQ ID NO: 151 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 152 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 153 (péptido señal de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 154 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-ligeros mostrados en SEQ ID NO: 155 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 156 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 157 (péptido señal de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 158 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-ligeros mostrados en SEQ ID NO: 159 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 160 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 161 (péptido señal de CETP). La cadena ligera de SEQ ID NO: 162 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-ligeros mostrados en SEQ ID NO: 163 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 164 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 165 (péptido señal de CETP).

Cadenas pesadas de trastuzumab que tienen la secuencia N-terminal C, CP, CPP, CPR, CPS, CDKT, CDKTHT, CVE, y CDTPPP se muestran en SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 194 y SEQ ID NO: 198, respectivamente. La cadena pesada de SEQ ID NO: 166 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 167 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 168 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 169 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 170 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 171 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 172 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 173 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 174 se obtiene a partir de los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 175 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 176 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 177 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 178 se obtiene a partir de los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 179 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 180 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 181 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 182 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 183 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 184 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 185 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 186 se obtiene expresando los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 187 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 188 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 189 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 190 se obtiene a partir de los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 191 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 192 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 193 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 194 se obtiene a partir de los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 195 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 196 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 197 (péptido señal de CETP). La cadena pesada de SEQ ID NO: 198 se obtiene a partir de los polipéptidos quiméricos pre-cadena pesada mostrados en SEQ ID NO: 199 (péptido señal de SHH), SEQ ID NO: 200 (péptido señal de IFN) y SEQ ID NO: 201 (péptido señal de CETP).

Las células huésped adecuadas incluyen células embrionarias humanas 293 (ATCC CRL-1573) y células de ovario de hámster CHO-K1 (ATCC CCL-61) obtenidas a partir de la Colección americana de cultivos tipo (Rockville, Md.). Se hacen crecer células a 37ºC, en una atmósfera de aire, el 95%; dióxido de carbono, el 5%. Se mantienen células 293 en medio esencial mínimo (Eagle) con L-glutamina 2 mM y BSS de Earle ajustado para contener bicarbonato de sodio 1,5 g/l, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato de sodio 1,0 mM, el 90%; suero bovino fetal, el 10%. Se mantienen células CHO-K1 en medio F12K de Ham con L-glutamina 2 mM ajustado para contener bicarbonato de sodio 1,5 g/l, el 90%; suero bovino fetal, el 10%. Otras células huésped adecuadas incluyen células de riñón de mono CV1 (ATCC CCL-70), células de riñón de mono COS-7 (ATCC CRL-1651), células de riñón de mono VERO-76 (ATCC CRL-1587), células de cuello uterino humanas HELA (ATCC CCL-2), células de pulmón humanas W138 (ATCC CCL-75), células de riñón caninas MDCK (ATCC CCL-34), células de hígado de rata BRL3A (ATCC CRL-1442), células de riñón de hámster BHK (ATCC CCL-10), células de mama de ratón MMT060562 (ATCC CCL-51) y linfocitos T $CD8^+$ humanos (descrito en el documento estadounidense con n.º de serie 08/258.152).

Ejemplos de vectores de expresión adecuados son pCDNA3.1(+) mostrado en SEQ ID NO: 97 y pSA mostrado en SEQ ID NO: 98. El plásmido pSA contiene los siguientes elementos de secuencia de ADN: 1) pBluescriptIIKS(+) (nucleótidos 912-2941/1-619, n.º de registro de GenBank X52327), 2) un promotor de citomegalovirus humano, potenciador y donador de corte y empalme de primer exón (nucleótidos 63-912, n.º de registro de GenBank K03104), 3) un aceptor de corte y empalme de segundo exón de alfa1-globina humana (nucleótidos 6808-6919, n.º de registro de GenBank J00153), 4) un sitio de poliadenilación de antígeno T de SV40 (nucleótidos 2770-2533, Reddy *et al.* (1978) Science 200, 494-502), y 5) un origen de replicación de SV40 (nucleótidos 5725-5578, Reddy *et al.*, *ibid*). Otros vectores de expresión adecuados incluyen los plásmidos pSVeCD4DHFR y pRKCD4 (patente estadounidense n.º 5.336.603), plásmido pIK.1.1 (patente estadounidense n.º 5.359.046), plásmido pVL-2 (patente estadounidense n.º 5.838.464), plásmido pRT43.2F3 (descrito en el documento estadounidense con n.º de serie 08/258.152).

Pueden construirse vectores de expresión adecuados para polipéptidos pre-Fc de IgG humana mediante la ligación de un fragmento de vector HindIIIPspOM1 preparado a partir de SEQ ID NO: 98, con un fragmento de inserción HindIII-EagI preparado a partir de SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 68, 70, 72, 76, 78, 80, 84, 86, 88, 92, 94 y 96.

Los marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de neomicina fosfotransferasa (NEO) de transposón de Tn5 (Southern y Berg (1982) J. Mol. Appl. Gen. 1, 327-341), y el ADNc de dihidrofolato reductasa (DHFR) (Lucas *et*

al. (1996) Nucl. Acids Res. 24, 1774-1779). Un ejemplo de un vector de expresión adecuado que incorpora un gen de NEO es plásmido pSA-NEO, que se construye ligando un primer fragmento de ADN, preparado digiriendo SEQ ID NO: 99 con EcoRI y BglII, con un segundo fragmento de ADN, preparado digiriendo SEQ ID NO: 98 con EcoRI y BglII. SEQ ID NO: 99 incorpora un gen de NEO (nucleótidos 1551 a 2345, n.º de registro de Genbank U00004) precedido por una secuencia para el inicio de la traducción (Kozak (1991) J. Biol. Chem, 266, 19867-19870). Otro ejemplo de un vector de expresión adecuado que incorpora un gen de NEO y un ADNc de DHFR es plásmido pSVe-NEO-DHFR, que se construye ligando un primer fragmento de ADN, preparado digiriendo SEQ ID NO: 99 con EcoRI y BglII, con un segundo fragmento de ADN, preparado digiriendo pSVeCD4DHFR con EcoRI y BglII. El plásmido pSVe-NEO-DHFR usa promotor temprano/potenciadores de SV40 para impulsar la expresión del gen de NEO y del ADNc de DHFR. Otros marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de XPGT (Mulligan y Berg (1980) Science 209, 1422-1427) y el gen de resistencia a la higromicina (Sugden *et al*. (1985) Mol. Cell. Biol. 5, 410-413).

En una realización, se transfectan células mediante el método de fosfato de calcio de Graham *et al*. (1977) J. Gen. Virol. 36, 59-74. Se disuelve una mezcla de ADN (10 ug) en 0,5 ml de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM y $CaCl_2$ 227 mM. La mezcla de ADN contiene (en una razón de 10:1:1) el ADN de vector de expresión, el ADN de marcador seleccionable y un ADN que codifica para el gen de ARN de VA (Thimmappaya *et al*. (1982) Cell 31, 543-551). A esta mezcla se le añaden, gota a gota, 0,5 ml de Hepes 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM y $NaPO_4$ 1,5 mM. Se deja que se forme el precipitado de ADN durante 10 minutos a 25ºC, después se suspende y se añade a células que se hacen crecer hasta la confluencia en placas de cultivo tisular de plástico de 100 mm. Después de 4 horas a 37ºC, se aspira el medio de cultivo y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 0,5 minutos. Después se lavan las células con medio libre de suero, se añade medio de cultivo recién preparado y se incuban las células durante 5 días.

En otra realización, se transfectan transitoriamente células mediante el método de sulfato de dextrano de Somparyrac *et al*. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. 12, 7575-7579. Se hacen crecer células hasta la máxima densidad en matraces de centrifugación, se concentran mediante centrifugación y se lavan con PBS. Se incuba el precipitado de ADN-dextrano sobre el sedimento celular. Después de 4 horas a 37ºC, se aspira el DEAE-dextrano y se añade glicerol al 20% en PBS durante 1,5 minutos. Después se lavan las células con medio libre de suero, vuelven a introducirse en matraces de centrifugación que contienen medio de cultivo recién preparado con insulina bovina 5 microgramos/ml y transferrina bovina 0,1 microgramos/ml, y se incuban durante 4 días.

Tras la transfección mediante cualquier método, los medios condicionados se centrifugan y se filtran para retirar los residuos y las células huésped. Después se concentra la muestra que contiene el dominio Fc y se purifica mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna (véase a continuación). Para identificar el dominio Fc en el sobrenadante de cultivo celular, se retira el medio de cultivo de 24 a 96 horas después de la transfección, se concentra y se analiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en presencia o ausencia de un agente reductor tal como ditiotreitol.

Para la expresión sin amplificar, se transfectan plásmidos en células 293 humanas (Graham *et al*., J. Gen. Virol. 36:59 74 (1977)), usando un procedimiento de alta eficacia (Gorman *et al*., DNA Prot. Eng. Tech. 2:3 10 (1990)). Se cambian los medios por libres de suero y se recogen diariamente durante hasta cinco días. Para la expresión sin amplificar, se transfectan plásmidos en células 293 humanas (Graham *et al*., J. Gen. Virol. 36:59 74 (1977)), usando un procedimiento de alta eficacia (Gorman *et al*., DNA Prot. Eng. Tech. 2:3 10 (1990)). Se cambian los medios por libres de suero y se recogen diariamente durante hasta cinco días. Se purifican los dominios Fc a partir del sobrenadante de cultivo celular usando proteína A HP HiTrap (Pharmacia). Se someten los dominios Fc eluidos a intercambio de tampón en PBS usando un dispositivo Centricon-30 (Amicon), se concentran hasta 0,5 ml, se esterilizan por filtración usando un dispositivo Millex-GV (Millipore) a 4ºC.

Tramos de aminoácidos consecutivos

Los ejemplos de tramos de aminoácidos consecutivos, tal como se denominan en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos consecutivos que incluyen dominios de unión tales como proteínas secretadas o transmembrana, dominios y anticuerpos de unión intracelular (completos o porciones de los mismos) y versiones modificadas de los mismos. Los siguientes son algunos ejemplos no limitativos:

1) Inmunoglobulinas

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada (por ejemplo, Fab y/o anticuerpos de un solo brazo).

La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de

anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tienen cadenas pesadas que contienen una región Fc tal como se define en el presente documento.

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe significativamente (o bien parcialmente o bien completamente) una actividad biológica del antígeno al que se une.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en el 50% o más, y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en el 50% o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia a modo de ejemplo.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones de marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al*. Kuby Immunology, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para examinar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al*., J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson *et al*., Nature 352:624-628 (1991).

El término "región hipervariable" o "HVR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a la secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVR; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden generalmente residuos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), teniendo estas últimas la variabilidad de secuencia más alta y/o participando en el reconocimiento de antígeno. Los bucles hipervariables a modo de ejemplo se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las CDR a modo de ejemplo (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2, y 95-102 de H3. (Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden generalmente los residuos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de especificidad" o "SDR", que son residuos que entran en contacto con antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las CDR denominadas CDR abreviadas, o a-CDR. Las a-CDR a modo de ejemplo (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, y a-CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2, y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)). A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en el presente documento según Kabat *et al*., citado anteriormente.

"Marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable distintos de residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

La frase "cadena pesada truncada en el extremo N-terminal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende partes, pero no la totalidad, de una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa, en el que las partes que faltan son las que están normalmente ubicadas en la región N-terminal de la cadena pesada. Las partes que faltan pueden incluir el, pero no se limitan al, dominio variable, CH1, y parte o la totalidad de una secuencia de bisagra. Generalmente, si la secuencia de bisagra silvestre no está presente, el/los dominio(s) constante(s) restante(s) en la cadena pesada truncada en el extremo N-terminal comprenderá(n) un componente que puede unirse a otra secuencia de Fc (es decir, el "primer" polipéptido de Fc tal como se describe en el presente documento). Por ejemplo, dicho componente puede ser un residuo modificado o un residuo de cisteína añadido que puede formar una unión disulfuro.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas realizaciones, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas realizaciones, un FcR es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas sometidas a corte y empalme alternativos de esos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren

principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase, por ejemplo, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identificarán en el futuro, quedan abarcados por el término "FcR" en el presente documento.

El término "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor de nenonato, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24:249 (1994)) y regulación de homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen métodos de medición de la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión con alta afinidad a FcRn humano pueden someterse a ensayo, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.* J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001).

La "región de bisagra", "secuencia de bisagra" y variaciones de las mismas, tal como se usan en el presente documento, incluyen el significado conocido en la técnica, que se ilustra, por ejemplo, en Janeway *et al.*, Immuno Biology: the immune system in health and disease (Elsevier Science Ltd., NY) (4ª ed., 1999); Bloom *et al.*, Protein Science (1997), 6:407-415; Humphreys *et al.*, J. Immunol. Methods (1997), 209:193-202.

A menos que se indique lo contrario, la expresión "anticuerpo multivalente" se usa a lo largo de la totalidad de esta memoria descriptiva para designar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente se diseña preferiblemente por ingeniería para tener los tres o más sitios de unión a antígeno y generalmente no es un anticuerpo de IgM o IgA de secuencia nativa.

Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión a, y reconocimiento de, antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera en estrecha asociación, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De manera colectiva, las seis HVR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que sólo comprende tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque habitualmente a una afinidad inferior al sitio de unión completo.

El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ comprenden un par de fragmentos Fab que están generalmente unidos de manera covalente cerca de sus extremos carboxilo-terminal mediante cisteínas de bisagra entre los mismos. En la técnica también se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

La frase "brazo de unión a antígeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una parte componente de un fragmento de anticuerpo que tiene la capacidad de unirse específicamente a una molécula diana de interés. De manera general y preferible, el brazo de unión a antígeno es un complejo de secuencias de polipéptidos de inmunoglobulina, por ejemplo, HVR y/o secuencias de dominio variable de una cadena ligera y pesada de inmunoglobulina.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un grupo de unión de polipéptido entre los dominios VH y VL, que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH y VL). Usando un grupo de unión que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_HC_{H1}) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los

anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones que se producen de manera natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando generalmente tales variantes presentes en cantidades minoritarias. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo el, pero sin limitarse al, método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que usan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulinas humanas, describiéndose tales métodos y otros métodos a modo de ejemplo para preparar anticuerpos monoclonales en el presente documento.

El término anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

Un “anticuerpo humano” es uno que presenta una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o se deriva de una fuente no humana que usa repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican para anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un “anticuerpo desnudo” se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los “anticuerpos nativos” se refieren a moléculas de inmunoglobulina que se producen de manera natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera similar, desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguida por un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

“Afinidad” se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. A continuación se describen realizaciones ilustrativas y a modo de ejemplo específicas para medir la afinidad de unión.

Un anticuerpo “madurado en cuanto a afinidad” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más HVR, en comparación con un anticuerpo original que no presenta tales alteraciones, dando tales alteraciones como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado es uno que presenta una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

Un “sitio de unión a antígeno funcional” de un anticuerpo es uno que puede unirse a un antígeno diana. La afinidad de

unión a antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesariamente tan fuerte como la del anticuerpo original a partir del cual se deriva el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad de unión a antígeno debe poder medirse usando uno cualquiera de una variedad de métodos conocidos para evaluar la unión de anticuerpo a un antígeno. Además, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente en el presente documento no necesita ser cuantitativamente la misma. Para los anticuerpos multiméricos en el presente documento, el número de sitios de unión a antígeno funcionales puede evaluarse usando análisis por ultracentrifugación tal como se describe en el ejemplo 2 de la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050186208. Según este método de análisis, se combinan diferentes razones de antígeno diana con respecto a anticuerpo multimérico y se calcula el peso molecular promedio de los complejos suponiendo diferentes números de sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos con el fin de evaluar el número de sitios de unión funcionales.

Un “anticuerpo dependiente de especie” es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie “se une específicamente” a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1 x 10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1 x 10^{-8} M y lo más preferiblemente no más de aproximadamente 1 x 10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos tal como se definió anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo dependiente de especie es un anticuerpo humanizado o humano.

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta una pureza superior al 95% o al 99% tal como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de fase inversa o intercambio iónico). Para la revisión de métodos para la evaluación de la pureza de anticuerpo, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

2) Proteínas extracelulares

Las proteínas extracelulares desempeñan papeles importantes, entre otras cosas, en la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. Se expone una discusión de diversas proteínas intracelulares de interés en la patente estadounidense n.º 6.723.535, Ashkenazi *et al.*, concedida el 20 de abril de 2004.

El destino de muchas células individuales, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, está gobernado normalmente por la información recibida a partir de otras células y/o el entorno inmediato. Esta información se transmite con frecuencia por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que a su vez se reciben e interpretan por diversos receptores celulares o proteínas unidas a membrana. Estos polipéptidos secretados o moléculas de señalización pasan normalmente a través de la trayectoria secretora celular para alcanzar su sitio de acción en el entorno extracelular.

Las proteínas secretadas tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo como productos farmacéuticos, productos de diagnóstico, biosensores y biorreactores. La mayoría de los fármacos de proteínas disponibles en la actualidad, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleucinas, eritropoyetinas, factores estimulantes de colonias y diversas otras citocinas, son proteínas secretoras. Sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Están emprendiéndose esfuerzos tanto por la industria como por el sector académico para identificar nuevas proteínas secretadas nativas. Muchos esfuerzos se centran en la exploración de bibliotecas de ADN recombinante de mamíferos para identificar las secuencias codificantes de proteínas secretadas novedosas. Se describen ejemplos de métodos y técnicas de exploración en la bibliografía (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:7108-7113 (1996); patente estadounidense n.º 5.536.637).

Las proteínas y receptores unidos a membrana pueden desempeñar papeles importantes, entre otras cosas, en la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, está regido normalmente por información recibida a partir de otras células y/o del entorno inmediato. Esta información se transmite con frecuencia por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que a su vez se reciben y se interpretan por diversos receptores celulares o proteínas unidas a membrana. Tales proteínas unidas a membrana y receptores celulares incluyen, pero no se limitan a, receptores de citocinas, cinasas receptoras, fosfatasas receptoras, receptores que participan en interacciones célula-célula, y moléculas de adhesión celular tales como selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular se regula en parte mediante fosforilación de diversas proteínas celulares. Las proteína tirosina cinasas, enzimas que catalizan ese proceso, también pueden actuar como receptores de factores de crecimiento. Los ejemplos incluyen receptor de factor de crecimiento de fibroblastos y receptor de factor de crecimiento nervioso.

Las proteínas unidas a membrana y moléculas receptoras tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. Pueden emplearse inmunoadhesinas receptoras, por ejemplo, como agentes terapéuticos para bloquear interacciones receptor-ligando. Las proteínas unidas a membrana también pueden emplearse para explorar posibles inhibidores de molécula pequeña o péptido de la interacción receptor/ligando relevante.

3) Síntesis C-terminales basadas en inteína

Tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.849.428, concedida el 1 de febrero de 2005, las inteínas son la proteína equivalente de los intrones de ARN de autoempalme (véase Perler *et al*., Nucleic Acids Res. 22:1125-1127 (1994)), que catalizan su propia escisión a partir de una proteína precursora con la fusión concomitante de las secuencias de proteínas flanqueantes, conocidas como exteínas (revisado en Perler *et al*., Curr. Opin. Chem. Biol. 1:292-299 (1997); Perler, F. B. Cell 92(1):1-4 (1998); Xu *et al*., EMBO J. 15(19):5146-5153 (1996)).

Estudios sobre el mecanismo del corte y empalme de inteínas condujeron al desarrollo de un sistema de purificación de proteínas que usó la escisión inducida por tiol del enlace peptídico en el extremo N-terminal de la inteína Sce VMA (Chong *et al*., Gene 192(2):271-281 (1997)). La purificación con este sistema mediado por inteína genera una proteína expresada en bacterias con un tioéster C-terminal (Chong *et al*., (1997)). En una aplicación, en la que se describe aislar una proteína citotóxica, la proteína expresada en bacterias con el tioéster C-terminal se fusiona después a un péptido químicamente sintetizado con una cisteína N-terminal usando la química descrita para “ligación química nativa” (Evans *et al*., Protein Sci. 7:2256-2264 (1998); Muir *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6705-6710 (1998)).

Esta técnica, denominada “ligación de proteínas mediada por inteína” (IPL), representa un avance importante en técnicas de semisíntesis de proteínas. Sin embargo, dado que los péptidos químicamente sintetizados de más de aproximadamente 100 residuos son difíciles de obtener, la aplicación general de IPL se limitó por el requisito de un péptido químicamente sintetizado como pareja de ligación.

La tecnología de IPL se expandió significativamente cuando se generó una proteína expresada con un extremo N-terminal predeterminado, tal como cisteína, tal como se describe por ejemplo en la patente estadounidense n.º 6.849.428. Esto permite la fusión de una o más proteínas expresadas a partir de una célula huésped, tal como células bacterianas, de levadura o de mamífero. En un ejemplo no limitativo, se usa la inteína de un *Methanobacterium thermoautotrophicum* RIR1 modificado que se escinde o bien en el extremo C-terminal o bien en el extremo N-terminal, lo cual permite la liberación de una proteína expresada en bacterias durante una purificación en una columna, eliminando por tanto totalmente la necesidad de proteasas.

La tecnología de inteína es un ejemplo de una vía para obtener componentes. En una realización, las subunidades de los compuestos de la invención se obtienen mediante transfección de células adecuadas, que pueden expresar y secretar polipéptidos quiméricos maduros, en las que tales polipéptidos comprenden, por ejemplo, un dominio de adhesina contiguo con un dominio de inteína C-terminal aislable (véase la patente estadounidense n.º 6.849.428, Evans *et al*., concedida el 1 de febrero de 2005). Las células, tales como células de mamífero o células bacterianas, se transfectan usando técnicas de ADN recombinante conocidas. Entonces, puede aislarse el polipéptido quimérico secretado, por ejemplo usando una resina derivatizada con quitina en el caso de un dominio de unión a inteína-quitina (véase la patente estadounidense n.º 6.897.285, Xu *et al*., concedida el 24 de mayo de 2005), y después se trata en condiciones que permiten la escisión y liberación mediada por tiol de la subunidad terminada en tioéster ahora C-terminal. La subunidad de adhesión terminada en tioéster se convierte fácilmente en una subunidad terminada en cisteína C-terminal.

Por ejemplo, tras una reacción de autoescisión de inteína, se genera un producto intermedio de tioéster que permite la adición fácil de cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína, o un derivado de cisteína, selenocisteína, homocisteína, homoselenocisteína, al extremo C-terminal mediante ligación química nativa. Métodos de adición de una cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína, o un derivado de cisteína, selenocisteína, homocisteína, homoselenocisteína, al extremo C-terminal mediante ligación química nativa que son útiles en aspectos de la presente invención se describen en la solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0254512, Capon, publicada el 16 de octubre de 2008.

Kits

Otro aspecto (no reivindicado) proporciona kits que comprenden los compuestos dados a conocer en el presente documento y las composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos. Un kit puede incluir, además del compuesto o la composición farmacéutica, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones de uso en un método de diagnóstico o terapéutico. En una realización de diagnóstico, el kit incluye el compuesto o una composición farmacéutica del mismo y un agente de diagnóstico. En una realización terapéutica, el kit incluye el anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo y uno o más agentes terapéuticos, tales como un agente antineoplásico adicional, agente antitumoral o agente quimioterápico.

Técnicas generales

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de tramos de aminoácidos consecutivos o

polipéptidos de interés cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene un ácido nucleico codificante. Evidentemente, se contempla que pueden emplearse métodos alternativos, que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos, o porciones de la misma, puede producirse mediante síntesis de péptidos directa usando técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al*., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)). Puede realizarse la síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, Calif.) usando las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente por separado diversas porciones de los tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir los tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés de longitud completa.

1. Selección y transformación de células huésped

Se transfectan o se transforman células huésped con vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para la producción y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por el experto en la técnica sin excesiva experimentación. En general, pueden encontrarse principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al*., citado anteriormente.

El experto habitual en la técnica conoce métodos de transfección de célula eucariotas y transformación de células procariotas, por ejemplo, $CaCl_2$, $CaPO_4$, mediados por liposoma y electroporación. Dependiendo de la célula huésped usada, se realiza la transformación usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook *et al*., citado anteriormente, o la electroporación se usan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de determinadas células vegetales, tal como se describe por Shaw *et al*., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares, puede emplearse el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de transfecciones en sistema huésped de célula de mamíferos en la patente estadounidense n.º 4.399.216. Normalmente se llevan a cabo transformaciones en levadura según el método de Van Solingen *et al*., J. Bact., 130:946(1977) y Hsiao *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células, tal como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véase Keown *et al*., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al*., Nature, 336:348-352 (1988).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *E. coli*. Hay diversas cepas de *E. coli* públicamente disponibles, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium, Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P dado a conocer en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitativos. La cepa W3110 es un huésped particularmente preferido o huésped original porque es una cepa huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para realizar una mutación genética en los genes que codifican para proteínas endógenas para el huésped, incluyendo ejemplos de tales huéspedes *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo tonA; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo tonAptr3phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r, *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de deleción de degP no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante dada a conocer en la patente estadounidense n.º 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados métodos *in vitro* de clonación, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos.

Además de procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores de codificación. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior habitualmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290:140 (1981); documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces* (patente estadounidense n.º 4.943.529; Fleer *et al*., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. Lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al*., J. Bacteriol., 737 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al*., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia*

pastoris (documento EP 183.070; Sreekrishna *et al*., J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)); *Candida; Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al*., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983); Tilburn *et al*., Gene, 26:205-221 (1983); Yelton *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 (1984)) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475479 (1985)). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levaduras que pueden crecer en metanol seleccionadas de los géneros que consisten en *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis* y *Rhodotorula*. Puede encontrarse una lista de especies específicas que son a modo de ejemplo de esta clase de levaduras en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Células huésped adecuadas para la expresión de tramos glicosilados de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés se derivan a partir de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Ejemplos más específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al*., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino /-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humanas (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humanas (Hep G2, HB 8065); y tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula huésped apropiada está dentro de las habilidades en la técnica.

2. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica para el tramo de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés puede insertarse en un vector replicable para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Hay diversos vectores públicamente disponibles. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, se inserta ADN en un(os) sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de esos componentes emplea técnicas de ligación convencionales que se conocen por el experto en la técnica.

Los tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés pueden producirse de manera recombinante no sólo directamente, sino también como polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN codificante que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, a partir del grupo de líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasa, 1pp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, líder de factor alfa (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, éste último descrito en la patente estadounidense n.º 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990.

En la expresión en células de mamífero, pueden usarse secuencias señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una relacionada, así como líderes secretores virales.

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Tales secuencias se conocen bien para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmido del 2mu es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

Los vectores de expresión y clonación contendrán normalmente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica para D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para la captación del ácido nucleico codificante, tales como DHFR o timidina cinasa. Una

célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR silvestre es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada tal como se describe por Urlaub *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen trp1 presente en el plásmido de levaduras YRp7 (Stinchcomb *et al*., Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al*., Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al*., Gene, 10:157 (1980)). El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)).

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico codificante para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien promotores reconocidos por una variedad de posibles células huésped. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen los sistemas de promotor de beta-lactamasa y lactosa (Chang *et al*., Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al*., Nature, 281:544 (1979)), fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36.776) y promotores híbridos tales como el promotor tac (deBoer *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)). Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN codificante.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levaduras incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman *et al*., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Hess *et al*., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones de promotor para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras en el documento EP 73.657.

La transcripción a partir de vectores en células huésped de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus del simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

La transcripción de un ADN que codifica para los tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés mediante eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente desde 10 hasta 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias de potenciadores para genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede someterse a corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante, pero preferiblemente está ubicado en un sitio 5' desde el promotor.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas en 5' y, ocasionalmente en 3', de ADN o ADNc virales o de eucariotas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida de los tramos que codifican para ARNm de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés.

Todavía otros métodos, vectores y células huésped adecuados para su adaptación a la síntesis de tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos en cultivo de células de vertebrados recombinantes se describen en Geting *et al*., Nature 293:620-625 (1981); Mantei *et al*., Nature, 281:4046 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

3. Detección de la amplificación/expresión génica

La amplificación y/o expresión génica pueden medirse directamente en una muestra, por ejemplo, mediante transferencia de tipo Southern convencional, transferencia de tipo Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada de manera apropiada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, pueden marcarse

los anticuerpos y puede llevarse a cabo el ensayo en el que el dúplex se une a una superficie, de modo que, tras la formación del dúplex en la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Alternativamente, la expresión génica puede medirse mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y ensayo de cultivo tisular o líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de líquidos de muestra pueden ser o bien monoclonales o bien policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia nativa de tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés o contra un péptido sintético basándose en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra una secuencia exógena fusionada a ADN que codifica para un tramo de aminoácidos consecutivos o polipéptido de interés y que codifica para un epítopo de anticuerpo específico.

4. Purificación de polipéptido

Pueden recuperarse formas de los tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés a partir de medio de cultivo o a partir de lisados de células huésped. Si está unido a membrana, puede liberarse de la membrana usando una disolución de detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de los tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés pueden alterarse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica o agentes de lisado celular.

Puede desearse purificar los tramos de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación en etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatoenfoque; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para retirar contaminantes tales como IgG; y columnas de quelación de metales para unirse a formas marcadas con etiqueta de epítopo. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y tales métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y de los tramos particulares de aminoácidos consecutivos o polipéptidos de interés producidos.

Ejemplo de expresión de tramo de aminoácidos consecutivos o componente de polipéptido de interés en E. coli

La secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos deseada de interés o polipéptido se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede emplearse una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. Se digiere el vector con enzima de restricción y se desfosforila. Después se ligan las secuencias amplificadas por PCR en el vector. El vector incluirá preferiblemente secuencias que codifican para un gen de resistencia a antibiótico, un promotor trp, un líder de polihis (incluyendo los seis primeros codones de STII, secuencia de polihis y sitio de escisión de enterocinasa), la secuencia de aminoácidos específica de interés / región codificante de polipéptido, terminador de transcripción lambda y un gen de argU.

Después se usa la mezcla de ligación para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Se identifican transformantes mediante su capacidad para crecer en placas de LB y después se seleccionan colonias resistentes a antibiótico. Puede aislarse ADN de plásmido y confirmarse mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Pueden hacerse crecer clones seleccionados durante la noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB complementado con antibióticos. El cultivo durante la noche puede usarse posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. Después se hacen crecer las células hasta una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de expresión.

Después de cultivar las células durante varias horas más, pueden recogerse las células mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido mediante la centrifugación puede solubilizarse usando diversos agentes conocidos en la técnica, y después puede purificarse la secuencia de aminoácidos solubilizada de interés o polipéptido usando una columna de quelación de metales en condiciones que permiten una estrecha unión de la proteína.

Los cebadores pueden contener sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de la traducción eficiente y fiable, purificación rápida en una columna de quelación de metales, y retirada proteolítica con enterocinasa. Las secuencias marcadas con etiqueta de poli-His, amplificadas por PCR, pueden ligarse en un vector de expresión usado para transformar un huésped de *E. coli* basándose, por ejemplo, en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). En primer lugar pueden hacerse crecer transformantes en LB que contiene carbenicilina a 50 mg/ml a 30ºC con agitación hasta que se alcanza una DO600 de 3-5. Después se diluyen los cultivos 50-100 veces

en medios CRAP (preparados mezclando 3,57 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,71 g de citrato de sodio-$2H_2O$, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y $MgSO_4$ 7 mM) y se hacen crecer durante aproximadamente 20-30 horas a 30ºC con agitación. Se retiran las muestras para verificar la expresión mediante análisis mediante SDS-PAGE, y se centrifuga el cultivo a granel para sedimentar las células. Se congelaron los sedimentos celulares hasta su purificación y replegamiento.

Se resuspendió la pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (6-10 g de sedimentos) en 10 volúmenes (p/v) en tampón de guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Se añade sulfito de sodio sólido y tetrationato de sodio para producir concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y se agitó la disolución durante la noche a 4ºC. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados mediante sulfitolización. Se centrifugó la disolución a 40.000 rpm en una ultracentrifugadora Beckman durante 30 min. Se diluyó el sobrenadante con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelato de metal (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtró a través de filtros de 0,22 micrómetros para aclararlo. Dependiendo se cargó el extracto aclarado en una columna de quelato de metal 5 mil Qiagen Ni-NTA equilibrada en el tampón de columna de quelato de metal. Se lavó la columna con tampón adicional que contenía imidazol 50 mM (Calbiochem, calidad Utrol), pH 7,4. Se eluyó la proteína con tampón que contenía imidazol 250 mM. Se combinaron las fracciones que contenían la proteína deseada y se almacenaron a 4ºC. Se estimó la concentración de proteína mediante su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.

Expresión de tramo de aminoácidos consecutivos o polipéptidos en células de mamífero

Este ejemplo general ilustra una preparación de una forma glicosilada de una secuencia de aminoácidos deseada de interés o componente de polipéptido mediante expresión recombinante en células de mamífero.

Puede emplearse el vector pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989) como vector de expresión. Opcionalmente, se liga el ADN codificante en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN usando métodos de ligación tales como los descritos en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Se hacen crecer células 293 humanas (ATCC CCL 1573) hasta la confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM complementado con suero de ternero fetal y, opcionalmente, componentes de nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 μg del ADN de vector ligado con aproximadamente 1 μg de ADN que codifica para el gen de ARN de VA [Thimmappaya *et al.*, Cell 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 μl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, $CaCl_2$ 0,227 M. A esta mezcla se le añaden, gota a gota, 500 μl de HEPES de 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, $NaPO_4$ 1,5 mM, y se deja que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25ºC. Se suspende el precipitado y se añade a las células 293 y se deja que sedimente durante aproximadamente cuatro horas a 37ºC. Se elimina por aspiración el medio de cultivo y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. Después se lavan las células 293 con medio libre de suero, se añade medio recién preparado y se incuban las células durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, se retira el medio de cultivo y se sustituye por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene ^{35}S-cisteína 200 pCi/ml y ^{35}S-metionina 200 μCi/ml. Después de una incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga sobre un gel con SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia de secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse a incubación adicional (en medio libre de suero) y se somete el medio a prueba en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, la secuencia de aminoácidos de ácido nucleico de interés o componente de polipéptido puede introducirse en células 293 de manera transitoria usando el método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Se hacen crecer células 293 hasta su densidad máxima en un matraz de centrifugación y se añaden 700 μg del vector ligado. En primer lugar se concentran las células a partir del matraz de centrifugación mediante centrifugación y se lavan con PBS. Se incuba el precipitado de ADN-dextrano sobre el sedimento celular durante cuatro horas. Se tratan las células con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular y vuelven a introducirse en el matraz de centrifugación que contiene medio de cultivo tisular, insulina bovina 5 μg/ml y transferrina bovina 0,1 μg/ml. Después de aproximadamente cuatro días, se centrifugan los medios condicionados y se filtran para retirar células y residuos. Después puede concentrarse la muestra que contiene la secuencia de aminoácidos expresada de interés o componente de polipéptido y purificarse mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, la secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido puede expresarse en células CHO. La secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido puede transfectarse en células CHO usando reactivos conocidos tales como $CaPO_4$ o DEAE-dextrano. Tal como se describió anteriormente, pueden incubarse los cultivos celulares, y sustituirse el medio por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador tal como ^{35}S-metionina. Después de determinar la presencia de secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido, puede sustituirse el medio de cultivo por medio libre de suero. Preferiblemente, se incuban los cultivos durante aproximadamente 6 días y después se recoge el medio condicionado. Después puede

concentrarse el medio que contiene la secuencia de aminoácidos expresada de interés o componente de polipéptido y purificarse mediante cualquier método seleccionado.

También puede expresarse la secuencia de aminoácidos marcada con etiqueta de epítopo de interés o componente de polipéptido en células CHO huésped. La secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido puede subclonarse a partir de un vector pRK5. El inserto de subclón puede someterse a PCR para fusionarse en marco con una etiqueta de epítopo seleccionada tal como una etiqueta de poli-his en un vector de expresión de baculovirus. Después puede subclonarse el inserto de secuencia de aminoácidos marcada con etiqueta de poli-his de interés o componente de polipéptido en un vector impulsado por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Finalmente, pueden transfectarse las células CHO (tal como se describió anteriormente) con el vector impulsado por SV40. Puede realizarse el marcaje, tal como se describió anteriormente, para verificar la expresión. Después puede concentrarse el medio de cultivo que contiene la secuencia de aminoácidos marcada con etiqueta de poli-His expresada de interés o componente de polipéptido y purificarse mediante cualquier método seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad por quelato de Ni^{2+}.

En una realización la secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido se expresan como un constructo de IgG (inmunoadhesina), en el que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan con una secuencia de región constante de IgG1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma marcada con etiqueta de poli-His.

Tras la amplificación por PCR, se subclonan los ADN respectivos en un vector de expresión de CHO usando técnicas convencionales tal como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Se construyen vectores de expresión de CHO para tener sitios de restricción compatibles en 5' y 3' del ADN de interés para permitir el transporte por lanzadera conveniente de los ADNc. El vector usado en la expresión en células CHO es tal como se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y usa el promotor temprano/potenciador de SV40 para impulsar la expresión del ADNc de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

Expresión de tramo de aminoácidos consecutivos o polipéptidos en levaduras

El siguiente método describe la expresión recombinante de una secuencia de aminoácidos deseada de interés o componente de polipéptido en levaduras.

En primer lugar, se construyen vectores de expresión de levaduras para la producción intracelular o secreción de un tramo de aminoácidos consecutivos a partir del promotor de ADH2/GAPDH. Se inserta ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos deseada de interés o componente de polipéptido, un péptido señal seleccionado y el promotor en sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de la secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido. Para la secreción, puede clonarse ADN que codifica para el tramo de aminoácidos consecutivos en el plásmido seleccionado, junto con ADN que codifica para el promotor de ADH2/GAPDH, la secuencia señal/líder secretora de factor alfa de levadura y secuencias de grupo de unión (si se necesita) para la expresión del tramo de aminoácidos consecutivos.

Después, pueden transformarse células de levadura, tales como cepa de levadura AB110, con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido por tinción de los geles con tinte azul de Coomassie.

Posteriormente puede aislarse la secuencia de aminoácidos recombinante de interés o componente de polipéptido y purificarse retirando las células de levadura a partir del medio de fermentación mediante centrifugación y después concentración del medio usando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene la secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido puede purificarse adicionalmente usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

Expresión de tramos de tramo de aminoácidos consecutivos o polipéptidos en células de insecto infectadas por baculovirus

El siguiente método describe la expresión recombinante de tramos de aminoácidos consecutivos en células de insecto infectadas por baculovirus.

El ácido nucleico deseado que codifica para el tramo de aminoácidos consecutivos se fusiona en el sentido de 5' de una etiqueta de epítopo contenida en un vector de expresión de baculovirus. Tales etiquetas de epítopo incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (tales como regiones Fc de IgG). Puede emplearse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como pVL1393 (Novagen). En resumen, la secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido o la porción deseada de la secuencia de aminoácidos de interés o componente de polipéptido (tal como la secuencia que codifica para el dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones en 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). Después se dirigiere el producto con esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de

expresión.

El baculovirus recombinante se genera cotransfectando el plásmido anterior y ADN de virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando Lipofectin (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28ºC, se recogen los virus liberados y se usan para amplificaciones adicionales. La infección viral y expresión de proteína se realizan tal como se describe por O'Reilley *et al.*, Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

Después, puede purificarse la secuencia de aminoácidos marcada con etiqueta de poli-his expresada de interés o componente de polipéptido, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad por quelato de Ni^{2+} de la siguiente manera. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas por virus recombinante tal como se describe por Rupert *et al.*, Nature, 362:175-179 (1993). En resumen, se lavan células Sf9, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; $MgCl_2$ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP40 al 0,1%; KCl 0,4 M), y se sonican dos veces durante 20 segundos sobre hielo. Se aclaran los sonicados mediante centrifugación, y se diluye el sobrenadante 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm. Se prepara una columna de agarosa de Ni^{2+}-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. Se carga el extracto celular filtrado sobre la columna a 0,5 ml por minuto. Se lava la columna hasta A_{280} de nivel inicial con tampón de carga, momento en el cual se inicia la recogida de fracciones. A continuación, se lava la columna con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye proteína unida de manera no específica. Después de alcanzar de nuevo el nivel inicial de A_{280}, se desarrolla la columna con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o inmunotransferencia de tipo Western con Ni^{2+}-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Se combinan fracciones que contienen la secuencia marcada con etiqueta de His_{10} eluida y se dializan frente a tampón de carga.

Alternativamente, puede realizarse la purificación de la secuencia de aminoácidos marcada con etiqueta de IgG (o marcada con etiqueta de Fc) usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna de proteína A o proteína G.

Pueden purificarse constructos de proteínas que contienen Fc a partir de medios condicionados de la siguiente manera. Se bombean los medios condicionados sobre una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se equilibra en tampón de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, se lava la columna de manera extensa con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. Se neutraliza inmediatamente la proteína eluida recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. Posteriormente se desala la proteína altamente purificada en tampón de almacenamiento tal como se describió anteriormente para las proteínas marcadas con etiqueta de poli-His. Se verifica la homogeneidad de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PEG) y secuenciación de aminoácidos N-terminales mediante degradación de Edman.

Ejemplos de composiciones farmacéuticas (no reivindicadas)

A continuación se exponen ejemplos no limitativos de tales composiciones y dosificaciones:

Las composiciones que comprenden un compuesto que comprende un tramo de aminoácidos consecutivos que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia de etanercept (por ejemplo Enbrel) pueden comprender manitol, sacarosa y trometamina. En una realización, la composición está en forma de un liofilizado. En una realización, la composición se reconstituye, por ejemplo, con agua para inyección bacteriostática estéril (BWFI), USP (que contiene alcohol bencílico al 0,9%). En una realización el compuesto se administra a un sujeto para reducir signos y síntomas, inducir una respuesta clínica principal, inhibir la progresión de daño estructural, y mejorar la función física en sujetos con artritis reumatoide de moderada a gravemente activa. El compuesto puede iniciarse en combinación con metotrexato (MTX) o usarse solo. En una realización el compuesto se administra a un sujeto para reducir signos y síntomas de artritis reumatoide juvenil de curso poliarticular de moderada a gravemente activa en sujetos que han tenido una respuesta inadecuada a uno o más DMARD. En una realización el compuesto se administra a un sujeto para reducir signos y síntomas, inhibir la progresión de daño estructural de artritis activa y mejorar la función física en sujetos con artritis psoriásica. En una realización el compuesto se administra a un sujeto para reducir signos y síntomas en sujetos con espondilitis anquilosante activa. En una realización el compuesto se administra a un sujeto para el tratamiento de psoriasis en placas crónica de moderada a grave. En una realización en la que el sujeto tiene artritis reumatoide, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante, el compuesto se administra a 25-75 mg por semana administrados como una o más inyecciones subcutáneas (s.c.). En una realización adicional el compuesto se administra a 50 mg por semana en una única inyección s.c. En una realización en la que el sujeto tiene psoriasis en placas el compuesto se administra a 25-75 mg dos veces por semana o con 4 días de separación durante 3 meses seguido por una reducción hasta una dosis de mantenimiento de 25-75 mg por semana. En una realización adicional el compuesto se administra a una dosis de 50 mg dos veces por semana o con 4 días de separación durante 3 meses seguido por una reducción hasta una dosis de mantenimiento de 50 mg por semana. En una realización la dosis es entre 2x y 100x menos que las dosis expuestas en el presente documento. En una realización en la que el sujeto tiene JRA de curso poliarticular activa, el compuesto puede administrarse a una dosis de 0,2-1,2 mg/kg por semana (hasta un máximo de 75 mg por semana). En una realización adicional el compuesto se administra a una dosis de 0,8 mg/kg

por semana (hasta un máximo de 50 mg por semana). En algunas realizaciones la dosis es entre 2x y 100x menos que las dosis expuestas anteriormente en el presente documento.

Las composiciones que comprenden un compuesto que comprende un tramo de aminoácidos consecutivos que comprende aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia de infliximab (por ejemplo Remicade) pueden comprender sacarosa, polisorbato 80, fosfato de sodio monobásico, monohidratado, y fosfato de sodio dibásico, dihidratado. En una realización no hay conservantes presentes. En una realización, la composición está en forma de un liofilizado. En una realización, la composición se reconstituye, por ejemplo, con agua para inyección (BWFI), USP. En una realización el pH de la composición es de 7,2 o es de aproximadamente 7,2. En una realización el compuesto se administra se administra a un sujeto con artritis reumatoide en una dosis de 2-4 mg/kg administrada como una infusión intravenosa seguida por dosis similares adicionales a las 2 y 6 semanas después de la primera infusión, luego cada 8 semanas después de eso. En una realización adicional el compuesto se administra en una dosis de 3 mg/kg administrada como infusión intravenosa seguida por dosis similares adicionales a 2 y 6 semanas después de la primera infusión, luego cada 8 semanas después de eso. En una realización la dosis se ajusta hasta 10 mg/kg o tratando con una frecuencia de hasta cada 4 semanas. En una realización el compuesto se administra en combinación con metotrexato. En una realización el compuesto se administra se administra a un sujeto con enfermedad de Crohn o enfermedad de Crohn fistulizante a una dosis de 2-7 mg/kg administrada como régimen de inducción a las 0, 2 y 6 semanas seguido por un régimen de mantenimiento de 4-6 mg/kg cada 8 semanas después de eso para el tratamiento de enfermedad de Crohn o enfermedad fistulizante de moderada a gravemente activa. En una realización adicional el compuesto se administra a una dosis de 5 mg/kg administrada como régimen de inducción a las 0, 2 y 6 semanas seguido por un régimen de mantenimiento de 5 mg/kg cada 8 semanas después de eso para el tratamiento de enfermedad de Crohn o enfermedad fistulizante de moderada a gravemente activa. En una realización la dosis se ajusta hasta 10 mg/kg. En una realización el compuesto se administra a un sujeto con espondilitis anquilosante a una dosis de 2-7 mg/kg administrada como infusión intravenosa seguida por dosis similares adicionales a las 2 y 6 semanas después de la primera infusión, luego cada 6 semanas después de eso. En una realización adicional el compuesto se administra a una dosis de 5 mg/kg administrada como infusión intravenosa seguida por dosis similares adicionales a las 2 y 6 semanas después de la primera infusión, luego cada 6 semanas después de eso. En una realización el compuesto se administra a un sujeto con artritis psoriásica a una dosis de 2-7 mg/kg administrada como infusión intravenosa seguida por dosis similares adicionales a las 2 y 6 semanas después de la primera infusión, luego cada 8 semanas después de eso. En una realización adicional el compuesto se administra a una dosis de 5 mg/kg administrada como infusión intravenosa seguida por dosis similares adicionales a las 2 y 6 semanas después de la primera infusión, luego cada 8 semanas después de eso. En una realización el compuesto se administra con metotrexato. En una realización el compuesto se administra a un sujeto con colitis ulcerosa a una dosis de 2-7 mg/kg administrada como régimen de inducción a las 0, 2 y 6 semanas seguido por un régimen de mantenimiento de 2-7 mg/kg cada 8 semanas después de eso para el tratamiento de colitis ulcerosa de moderada a gravemente activa. En una realización adicional el compuesto se administra a un sujeto con colitis ulcerosa a una dosis de 5 mg/kg administrada como régimen de inducción a las 0, 2 y 6 semanas seguido por un régimen de mantenimiento de 5 mg/kg cada 8 semanas después de eso. En algunas realizaciones la dosis es entre 2x y 100x menor que las dosis expuestas anteriormente en el presente documento para tratar las enfermedades individuales.

En cada una de las realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, las composiciones, cuando están en forma de un liofilizado, pueden reconstituirse, por ejemplo, con disoluciones acuosas estériles, agua estéril, agua para inyecciones estéril (USP), agua para inyecciones bacteriostática estéril (USP) y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica.

Se entiende que en la administración de cualquiera de los presentes compuestos, el compuesto puede administrarse de manera aislada, en un portador, como parte de una composición farmacéutica o en cualquier vehículo apropiado.

Dosificación

Se entiende que cuando se menciona un intervalo de dosificación en el presente documento, por ejemplo de 1-10 mg/kg por semana, la invención dada a conocer en el presente documento también contempla cada dosis de número entero, y decimales de los mismos, entre los límites superior e inferior. Por tanto, en el caso del ejemplo facilitado, la invención contempla 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, etc., mg/kg hasta 10 mg/kg.

En realizaciones, los compuestos pueden administrarse como una única dosis o pueden administrarse como múltiples dosis.

En general, la dosificación diaria para tratar un trastorno o estado según los métodos descritos anteriormente oscilará generalmente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10,0 mg/kg de peso corporal del sujeto que va a tratarse.

Un médico experto habitual puede realizar variaciones basándose en los intervalos de dosificación anteriormente mencionados teniendo en cuenta consideraciones conocidas tales como el peso, edad y estado de la persona que está tratándose, la gravedad de la aflicción, y la vía de administración particular elegida.

También se espera que los compuestos dados a conocer produzcan una unión colaborativa con consecuencias relacionadas sobre las dosificaciones eficaces requeridas.

Productos farmacéuticos

Se entiende que el término “portador farmacéuticamente aceptable” incluye excipientes, portadores o diluyentes. El portador, diluyente o excipiente particular usado dependerá de los medios y del propósito para el que esté aplicándose el principio activo.

Para la administración parenteral, pueden emplearse disoluciones que contienen un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en disolución acuosa estéril. Tales disoluciones acuosas deben tamponarse de manera adecuada si es necesario y en primer lugar debe hacerse que el diluyente líquido se vuelva isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Los medios acuosos estériles empleados están todos ellos fácilmente disponibles mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables y que pueden administrarse por infusión), dispersiones o suspensiones. La forma preferida depende del modo de administración previsto y de la aplicación terapéutica. Algunas composiciones están en forma de disoluciones inyectables o que pueden administrarse por infusión. Un modo de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización, el compuesto se administra mediante inyección o infusión intravenosa. En otra realización, el compuesto se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Para uso terapéutico, las composiciones dadas a conocer en el presente documento pueden administrarse de diversas maneras, incluyendo en forma soluble mediante inyección en bolo, infusión continua, liberación sostenida a partir de implantes, ingestión oral, inyección local (por ejemplo intracardiaca, intramuscular), inyección sistémica u otras técnicas adecuadas bien conocidas en las técnicas farmacéuticas. Otros métodos de administración farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, métodos de administración oral, subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular y parenteral. Normalmente, una composición soluble comprenderá un compuesto purificado junto con portadores, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Tales portadores serán no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. La preparación de tales composiciones puede conllevar combinar un compuesto con tampones, antioxidantes, hidratos de carbono incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizadores y excipientes. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica conespecífica son diluyentes apropiados a modo de ejemplo. El producto puede formularse como liofilizado usando disoluciones de excipientes apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes.

Otros derivados comprenden los compuestos/composiciones unidos de manera covalente a un polímero no proteico. La unión al polímero se lleva a cabo generalmente de modo que no interfiere con la actividad biológica preferida del compuesto, por ejemplo la actividad de unión del compuesto a una diana. El polímero no proteico es habitualmente un polímero sintético hidrófilo, es decir, un polímero no encontrado de otro modo en la naturaleza. Sin embargo, polímeros que existen en la naturaleza y se producen mediante métodos recombinantes o *in vitro* son útiles, al igual que polímeros que se aíslan a partir de la naturaleza. Los polímeros de polivinilo hidrófilos se encuentran dentro del alcance de esta invención, por ejemplo poli(alcohol vinílico) y polivinilpirrolidona. Son particularmente útiles los poli(éteres de alquileno) tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, ésteres de polioxietileno o metoxi-polietilenglicol; polioxialquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno y copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (Pluronics); polimetacrilatos; carbómeros; polisacáridos ramificados o no ramificados que comprenden los monómeros de sacárido D-manosa, D y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-ácido glucurónico, ácido siálico, D-ácido galacturónico, D-ácido manurónico (por ejemplo poli(ácido manurónico), o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico incluyendo homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como lactosa, amilopectina, almidón, hidroxietilalmidón, amilosa, sulfato de dextrano, dextrano, dextrinas, glicógeno, o la subunidad de polisacárido de mucopolisacáridos ácidos, por ejemplo ácido hialurónico; polímeros de alcoholes de azúcar tales como polisorbitol y polimanitol; así como heparina o Heparon.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “cantidad profilácticamente eficaz” de un compuesto de la invención. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto puede variar según factores tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto queda compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, dado que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes, o en un estadio temprano, de una enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Detalles experimentales

EJEMPLO 1: TNR1B-alquino-azida-Fc6

Se preparó TNR1B-alquino-azida-Fc6 mediante la reacción de TNR1B modificado con alquino (receptor de TNF 1B) con Fc6 modificado con azida de la siguiente manera. Se prepara TNR1B-azida-alquino-Fc6 usando los mismos principios mediante la reacción de TNR1B modificado con azida con Fc6 modificado con alquino.

Se preparó TNFR1B modificado con alquino (TNR1B-Alk) mediante escisión de TNR1B-inteína (proteína de fusión de TNR1B-Mth) con cistil-propargilamida, $HSCH_2CH[NH_2]CONHCH_2C{\equiv}CH_3$ (figura 1) y se preparó TNR1B modificado con azida (TNR1B-Az) mediante escisión de TNR1B-inteína con cistil-3-azidopropilamida, $HSCH_2CH[NH_2]CONH(CH_2)_3NH_2$.

TNR1B-inteína y Fc6 se describen en el documento estadounidense con n.º de serie 11/982085, publicado el 16 de octubre de 2008.

Se produjo proteína de fusión de TNR1B-inteína usando vector pCDNA3-TNR1B-Mth, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 100. El polipéptido quimérico pre-TNR1B-inteína que se expresa inicialmente, que contiene el dominio extracelular de TNR1B unido en su extremo C-terminal mediante un enlace peptídico al extremo N-terminal de una intenína de autoempalme Mth RIR1 en el sitio de autoescisión, se muestra en SEQ ID NO: 101. La escisión de las secuencias señal de TNR homólogo mediante la señal peptidasa celular proporciona la proteína de fusión de TNR1B-inteína madura que se secreta al líquido de cultivo celular, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 102.

Se expresó la proteína Fc6 usando vector pCDNA3-SHH-IgG1-Fc11, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 103. El polipéptido pre-Fc6 que se expresa inicialmente se muestra en SEQ ID NO: 104. La escisión de las secuencias señal de sonic hedgehog (SHH) heterólogo mediante la señal peptidasa celular proporciona la proteína Fc6 madura que se secreta al líquido de cultivo celular, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 105.

Se llevó a cabo la producción de proteína mediante expresión transitoria en células CHO-DG44, adaptadas a cultivo en suspensión libre de suero. Se realizaron transfecciones transitorias con polietilenimina como agente de transfección, complejada con ADN, en condiciones de alta densidad tal como se describe por Rajendra *et al*., J. Biotechnol. 153, 22-26 (2011). Se mantuvieron cultivos de tren de semillas en 50 tubos de biorreactor TubeSpin® obtenidos de TPP (Trasadingen, CH) y se ampliaron a escala en cuanto al volumen para generar una biomasa suficiente para su transfección. Se llevaron a cabo transfecciones en cultivos de 0,5-1,0 l. Se mantuvieron cultivos a esta escala en botellas de Schott de 2 l o 5 l con un tapón ventilado. Se agitaron las botellas a 180 rpm en un agitador incubador de Kühner con humidificación y control de CO_2 al 5%. Se recogió el líquido de cultivo celular después de 10 días, se centrifugó y se esterilizó por filtración, antes de la purificación.

Se prepararon cistil-propargilamida y cistil-3-azidopropilamida de la siguiente manera. Boc-Cys(Trt)-OH, $(C_6H_5)_3CSCH_2CH[NHCO_2C(CH_3)_3]CO_2H$; propargilamina, $HC{\equiv}CCH_2NH$; 3-azidopropilamina, $NH_2CH_2CH_2CH_2N_3$; EDC, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida; y HOBt, 1-hidroxibenzotriazol, y se obtuvieron a partir de AnaSpec (Freemont, CA) o CPC Scientific (San Jose, CA). Todos los demás productos químicos se obtuvieron a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para la síntesis de cistil-propargilamida, se preparó una disolución de Boc-Cys(Trt)-OH (100 mM) y propargilamina (100 mM) en CH_2Cl_2 a 100 mM en cada uno de EDC, HOBt y trietilamina. Para la síntesis de cistil-3-azidopropilamida, se sustituyó propargilamina por 3-azidopropilamina (100 mM). Se sometieron ambas reacciones a tratamiento final mediante el siguiente procedimiento. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con un exceso de $NaHCO_3$ saturado en agua, se extrajo con CH_2Cl_2, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, se evaporó y se purificó mediante cromatografía en columna. Para retirar los grupos protectores Boc/Trt, se disolvió el producto intermedio a una concentración de 0,05 M en TFA/triisopropilsilano/H_2O (90:5:5) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se secó la reacción mediante evaporación y se extrajo con CH_2Cl_2. Después se extrajo la fase orgánica con agua, proporcionando el producto de cistil-propargilamida final como un aceite amarillento y el producto de cistil-3-azidopropilamida final como un sólido amarillento.

Para preparar el TNR1B modificado con alquino (figura 1) o el TNR1B modificado con azida, se aplicó la proteína TNR1B-inteína en el líquido de cultivo celular a una columna empaquetada con perlas de quitina obtenida de New England BioLabs (Beverley, MA) que se equilibró previamente con tampón A (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5). Se lavó la proteína no unida de la columna con tampón A. Se inició la escisión equilibrando rápidamente la resina de quitina en tampón B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8,0) que contenía o bien cistil-propargilamida 50 mM (para TNR1B modificado con alquino) o bien cistil-3-azidopropilamida 50 mM (para TNR1B modificado con azida) y se llevó a cabo la incubación durante de 24 a 96 horas a temperatura ambiente. Se eluyeron las proteínas TNR1B modificado con alquino (SEQ ID NO: 106) o TNR1B modificado con azida (SEQ ID NO: 107) escindidas de la columna con tampón A, se concentraron usando una unidad de filtro de centrífuga Amicon Ultracel-3 de Millipore (Billerica, MA), se dializaron frente a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin sales de Ca o Mg (PBS) obtenida de la UCSF Cell Culture Facility (San Francisco, CA) y se almacenaron a 4ºC antes de su uso.

La figura 2 muestra el análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) del TNR1B modificado con alquino, en comparación con TNR1B modificado con cisteína (SEQ ID NO: 108) preparado usando cisteína 50 mM en lugar de cistil-propargilamida. Se llevó a cabo SDS-PAGE usando geles NuPAGE® Novex Bis-Tris

Midi (al 10%) obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA). Se visualizaron las proteínas usando Silver Stain Plus o Bio-Safe Coomassie Stain obtenidos de Bio-Rad (Hercules, CA). El TNR1B modificado con alquino (carril 3) y el TNR1B modificado con cisteína (carril 1) tenían el mismo Mr ~43.000. Además, el TNR1B modificado con alquino tenía una actividad biológica comparable al TNR1B modificado con cisteína tal como se mide usando un ensayo ELISA Human sTNFRII/TNFRSF1B Quantikine obtenido de R&D Systems (Minneapolis, MN). Preparaciones del TNR1B modificado con cisteína (carril 2), TNR1B modificado con alquino (carril 4) o TNR1B modificado con tioéster (SEQ ID NO: 109) (carril 5) realizadas en presencia de MESNA 50 mM tenían Mr similares, pero tenían menos del 5% de la actividad biológica observada para preparaciones realizadas en ausencia de MESNA. Por tanto, se empleó TNR1B modificado con alquino preparado en ausencia de MESNA en estudios adicionales.

Se preparó Fc6 modificado con azida (Az-Fc6) mediante la reacción de proteína Fc6 con diversos tioésteres de péptidos que contenían azida (figura 3) y tioésteres de PEG que contenían azida (figura 4). Se preparó Fc6 modificado con alquino (Alk-Fc6) mediante la reacción de tioésteres que contenían alquino con proteína Fc6.

Se expresó proteína Fc6 recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) tal como se describe para TNR1B-inteína (véase anteriormente) y se purificó mediante cromatografía de afinidad por proteína A. Se aplicó el sobrenadante de cultivo a una columna empaquetada con rProtein A Fast Flow de Pharmacia (Uppsala, Suecia) previamente equilibrada con PBS. Se lavó la columna extensamente con PBS y después se eluyó la proteína Fc6 con tampón de glicina 0,1 M pH 2,7. Se recogieron las fracciones en tubos que contenían 0,05 vol/vol de Tris-HCl 1,0 M pH 9,0 (dando un pH final de 7,5), se combinaron, se dializaron frente a PBS y se almacenaron a 4ºC antes de su uso.

La tabla 1 muestra tioésteres de péptidos/PEG que contienen azida y que contienen alquino representativos. Se sintetizaron los tioésteres mediante una estrategia en fase sólida de Fmoc/t-Butilo en una resina de cloruro de 2-clorotritilo previamente cargada con Fmoc-Thr(tBu)-OH. Se obtuvieron derivados de aminoácido de CPC Scientific (Sunnyvale, CA), se obtuvieron derivados de Fmoc-PEG_n-OH de Quanta BioDesign (Powell, OH), y se obtuvieron hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HBTU), diclorometano (DCM), ácido tricloroacético (TFA), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N,N'-diisopropiletilamina (DIEA) y triisopropilsilano (TIS) de Sigma (St. Louis, MO). Se empleó la activación de HBTU convencional para la elongación de péptidos. Los péptidos que contenían PEG requirieron la inserción de Fmoc-PEG_n-OH. Como etapa final en la elongación de péptidos, se convirtió el grupo protector α-Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) terminal en Boc (terc-butoxicarbonilo). Se lavó la resina peptídica con DCM y se escindió con TFA al 1%/DCM para producir el péptido totalmente protegido con un ácido carboxílico libre en el extremo C-terminal. Se formó el tioéster de los péptidos tratando el péptido protegido en bruto con DIC/HOBt/DIEA y bencil-mercaptano o tiofenol en DCM durante la noche. Después de la concentración, se precipitó el tioéster de péptido protegido en bruto mediante múltiples trituraciones con éter frío seguido por centrifugación. Se llevó a cabo la desprotección mediante tratamiento del producto protegido en bruto con 95:2,5:2,5 de TFA/TIS/H_2O durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la precipitación con éter helado se purificó el tioéster de péptido desprotegido mediante RP-HPLC preparativa en un sistema de H_2O-acetonitrilo (TFA al 0,1%) para proporcionar el producto final con una pureza del 91-95% y el EM deseado.

Se prepararon Fc6 modificado con azida y Fc6 modificado con alquino mediante ligación química nativa de la siguiente manera. Se obtuvo ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) de Acros (Morris Plains, NJ), se obtuvo tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) de Pierce (Rockford, IL) y se obtuvo ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se llevaron a cabo reacciones mediante ligación de los diversos tioésteres mostrados en la tabla 1 con la proteína Fc6 de la siguiente manera. Las reacciones (100 ul) contenían tampón MES 50 mM, pH 6,5, TCEP 0,8 mM, MPAA 10 mM, 4 mg/ml del tioéster de péptido y 0,5 mg/ml de la proteína Fc6. Tras la incubación durante la noche a temperatura ambiente, se ajustaron las reacciones a pH 7,0 con 0,05 vol/vol de Tris-HCl 1,0 M pH 9,0, se purificaron usando perlas magnéticas de proteína A de New England BioLabs, se dializaron en fosfato 0,1 M pH 8,0, y se concentraron.

La figura 5 muestra el análisis mediante SDS-PAGE que demuestra que la proteína Fc6 (carril 1) reaccionó de manera cuantitativa con azida-DKTHT-tioéster para producir la proteína Az-DKTHT-Fc6 (carril 2) y azida-PEG_4-DKTHT-tioéster para producir la proteína Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 (carril 3). La secuencia de la proteína Az-DKTHT-Fc6 se muestra en SEQ ID NO: 110 y la secuencia de la Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 se muestra en SEQ ID NO: 111. El oligómero PEG_4 proporcionó un aumento de tamaño incremental comparable a la secuencia de 5 aminoácidos DKTHTD. Esto muestra que una única unidad de monómero de oxietileno realiza una contribución a la longitud de contorno similar a un único residuo de aminoácido, de manera compatible con el hecho de que tienen conformaciones totalmente extendidas comparables de ~3,5 a 4Å (Flory (1969) Statistical Mechanics of Chain Molecules (Interscience Publishers, Nueva York).

Se preparó TNR1B-alquino-azida-Fc6 mediante la reacción del TNR1B modificado con alquino con la proteína Az-DKTHT-Fc6 (figura 6) y la proteína Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 (figura 7). Se obtuvieron fosfato de sodio dibásico (anhidro) y fosfato de sodio monobásico (monohidratado) de Acros, TCEP era de Pierce, $CuSO_4$ (pentahidratado) era de Sigma-Aldrich, y Tris[1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA) de AnaSpec (Freemont, CA). Las reacciones (60 ul) contenían fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, $CuSO_4$ 1,0 mM, TBTA 2,0 mM, el TNR1B modificado con alquino (30 ug) y la proteína Fc6 sin modificar, la proteína Az-DKTHT-Fc6 o la proteína Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 (10 ug). Se iniciaron las reacciones mediante la adición de TCEP 2,0 mM y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Se purificaron los productos de reacción usando perlas magnéticas de proteína A para retirar cualquier TNR1B modificado

con alquino sin reaccionar.

La figura 8 muestra el análisis mediante SDS-PAGE de los productos de TNR1B-alquino-azida-Fc6 en condiciones reductoras. En ausencia de $CuSO_4$, TBTA y TCEP, tanto Az-DKTHT-Fc6 (carril 2) como Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 (carril 5) dieron una única banda de Mr ~ 28-30.000 Dalton (flecha d) correspondiente a las proteínas de Fc6 modificado con azida de entrada, sin ningún signo de formación de producto. Además, no hubo ninguna evidencia de ninguna transferencia del TNR1B modificado con alquino de entrada (mostrado en el carril 1) tras la purificación con proteína A. Sin embargo, en presencia de $CuSO_4$, TBTA y TCEP, la reacción entre TNR1B modificado con alquino y Az-DKTHT-Fc6 (carril 3) y la reacción entre TNR1B modificado con alquino y Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 (carril 6) produjeron ambas dos nuevos productos de Mr ~75.000 Dalton (flecha a) y ~65.000 Dalton (flecha b). Las reacciones llevadas a cabo usando una preparación de TNR1B modificado con alquino tras el intercambio de tampón en fosfato 0,1 M pH 8,0 para retirar sal dieron productos de reacción esencialmente similares tanto con Az-DKTHT-Fc6 (carril 4) como con Az-PEG_4-DKTHT-Fc6 (carril 6), aunque hubo un aumento significativo en el rendimiento del producto de Mr ~75.000 Dalton con respecto al producto de Mr ~65.000 Dalton.

La figura 9 muestra el análisis mediante SDS-PAGE que compara los productos de reacción de TNR1B-alquino-azida-Fc6 (panel izquierdo) y los productos de reacción de TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6 (panel derecho) con proteína de fusión TNR1B-Fc (etanercept). El producto TNR1B-alquino-azida-Fc6 de Mr ~75.000 Dalton (carril 2), que tenía la secuencia predicha mostrada en SEQ ID NO: 112, y el producto TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6 de Mr ~75.000 Dalton (carril 4), que tenía la secuencia predicha mostrada en SEQ ID NO: 113, son esencialmente indistinguibles en cuanto al tamaño con respecto a etanercept (carriles 1, 3), cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 114.

La figura 10 muestra el análisis mediante SDS-PAGE que proporciona evidencias adicionales que confirman el requisito de los grupos alquino y azida para la reactividad. Las mezclas de reacción que contenían TNR1B modificado con alquino con proteína de Fc6 sin modificar no dieron ningún producto de reacción (carril 2) en comparación con Fc6 solo (carril 1), mientras que TNR1B modificado con alquino con Az-DKTHT-Fc6 dio los productos esperados (carril 4) en comparación con Az-DKTHT-Fc6 solo (carril 3). De nuevo, ninguna transferencia del TNR1B modificado con alquino de entrada (mostrado en el carril 5) resultó evidente tras la purificación con proteína A.

Los productos de TNR1B-alquino-azida-Fc6 de la figura 10 se caracterizaron adicionalmente mediante secuenciación de su péptido tríptico mediante CL-EM. Tras la SDS-PAGE, se tiñó el gel con Coomassie y se escindieron cuatro regiones de gel, correspondientes al producto de Mr ~75.000 (flecha a), al producto de Mr ~65.000 (flecha b), la región sin teñir en la que migraba TNR1B modificado con alquino (flecha c), y la proteína Az-DKTHT-Fc6 sin reaccionar de Mr ~28.000 (flecha d). Se cortaron las cuatro secciones de gel para dar pequeños fragmentos (~0,5-1,0 mm^3) y se procesaron de la siguiente manera. Se obtuvieron bicarbonato de amonio, acetonitrilo, ditiotreitol y yodoacetamida de Sigma-Aldrich, se obtuvo ácido fórmico de Pierce, y se obtuvo tripsina porcina (calidad para secuenciación) de Promega (Madison, WI). Para retirar el tinte de Coomassie, se extrajo cada sección de gel con 200 ul de NH_4HCO_3 25 mM en acetonitrilo al 50% mediante agitación en vórtex, se centrifugó para retirar el sobrenadante y se deshidrató añadiendo acetonitrilo durante unos pocos minutos hasta que los fragmentos de gel se contrajeron y se volvieron blancos. Se descartó el acetonitrilo y se secaron las secciones de gel en un dispositivo Speed Vac (Savant Instruments, Farmingdale, NY). Después se llevaron a cabo la reducción y alquilación rehidratando las secciones de gel en 40 ul de ditiotreitol 10 mM en NH_4HCO_3 25 mM, se agitaron en vórtex y se incubaron a 56ºC durante 45 minutos. Después se descartó el sobrenadante, se añadieron 40 ul de yodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 25 mM, se agitaron las secciones de gel en vórtex y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se deshidrataron de nuevo las secciones de gel en acetonitrilo y se secaron en un dispositivo Speed Vac. Después se llevó a cabo la digestión con tripsina rehidratando las secciones de gel en 25 ul de tripsina (12,5 ug/ml) en NH_4HCO_3 25 mM sobre hielo durante 60 minutos. Después se retiró la disolución de tripsina en exceso, se cubrieron las secciones de gel con NH_4HCO_3 25 mM y se incubaron a 37ºC durante la noche. Se retiró el sobrenadante y después se extrajo el gel dos veces con 30 ul de acetonitrilo al 50%/ácido fórmico al 0,1% en agua. Se combinaron los extractos orgánicos con el sobrenadante acuoso, se redujeron hasta un volumen de 10 ul en un dispositivo Speed Vac, después se analizaron mediante CL-EM usando un espectrómetro de masas Q-Star Elite (AB SCIEX, Foster City, CA).

La figura 11 resume la caracterización de la estructura del producto de reacción de TNR1B-alquino-azida-Fc6 mediante espectrometría de masas. El producto de Mr ~75.000, tal como se esperaba para el producto de TNR1B-alquino-azida-Fc6 de longitud completa, contenía péptidos de las proteínas originales tanto TNR1B modificado con alquino como Fc6 modificado con azida. Además, la cobertura de péptido de la secuencia de TNR1B modificado con alquino (panel superior) se extendió desde la región N-terminal (EYYDQTAQMCCSK) hasta la región C-terminal (SMAPGAVHLPQPVST). De manera similar, la cobertura de péptido de la secuencia de proteína de Fc6 modificado con azida (panel inferior) se extendió desde la región N-terminal (DTLMISR) hasta la región C-terminal (TTPPPVLDSDGSFFLYSK). En cambio, Mr ~65.000 carecía del péptido EYYDQTAQMCCSK, lo que sugiere que era una versión delecionada en el extremo N-terminal del producto TNR1B-alquino-azida-Fc6 de longitud completa esperado. No se detectaron secuencias derivadas de la proteína TNR1B en la región sin teñir de Mr ~43.000 en la que migraría normalmente el TNR1B modificado con alquino (flecha c), mientras que sólo se detectaron secuencias derivadas de la proteína Fc6 en la proteína Az-DKTHT-Fc6 sin reaccionar de Mr ~28.000 (flecha d).

Se caracterizaron adicionalmente los productos TNR1B-alquino-azida-Fc6 y TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6 de la

figura 10 para determinar su actividad biológica midiendo su capacidad para unirse a TNF-α usando resonancia de plasmón superficial (SPR). Se obtuvo proteína TNF-α humana recombinante (libre de portador) de R&D Systems y se reconstituyó en PBS. Se llevaron a cabo estudios de SPR usando un instrumento Biacore T100 de Biacore AB (Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron los ligandos unidos a superficie, TNR1B-alquino-azida-Fc6 y TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6, sobre un chip sensor CM5, serie S, usando un kit de acoplamiento de amina (BR-1000-50) obtenido de GE Healthcare (Piscataway, NJ) según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la unión de TNF-α a 25ºC en tampón Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y Tween-20 al 0,005%. Se evaluó la unión por duplicado a concentraciones de TNF-α de 0,156 nM, 0,312 nM, 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 5,0 nM, 10,0 nM, 20,0 nM y 40 nM. Se evaluaron los datos usando el software de evaluación Biacore T100, versión 2.0.3.

La figura 12 muestra las curvas de unión cinética para TNR1B-alquino-azida-Fc6 (panel izquierdo) y TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6 (panel derecho). Ambos productos mostraron unión a TNF-α saturable, y se obtuvo un ajuste excelente empleando un modelo biexponencial (Chi^2 ~0,05). La tabla 2 resume los datos de unión cinética. Aproximadamente el 40% de los sitios de unión para cada producto tenían una afinidad superior, con una constante de disociación 1,6 veces mayor para TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6 (K_D = 1,86x10^{-10} M) que para TNR1B-alquino-azida-Fc6 (K_D = 2,99x10^{-10} M). El 60% restante de los sitios de unión tenían afinidad inferior, siendo las constantes de disociación aproximadamente iguales para TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6 (K_D = 5,12x10^{-9} M) y TNR1B-alquino-azida-Fc6 (K_D = 5,17x10^{-9} M). La asociación del grupo de unión PEG_4 con unión de alta afinidad aumentada, pero igual unión de baja afinidad, proporciona evidencias convincentes de un grado superior de unión colaborativa (con dos manos) de TNF-α mediante TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6 en comparación con TNR1B-alquino-azida-Fc6.

Tabla 1. Tioésteres que contienen azida y que contienen alquino

Nombre	Fórmula	Mr	MH+	Secuencia
Az-DKTHT	$C_{33}H_{47}O_{10}N_{11}S$	789,86	780,60	Azida-DKTHT-tioéster
Az-PEG4-DKTHT	$C_{44}H_{68}O_{15}N_{12}S$	1037,14	1038,20	Azida-PEG4-DKTHT-tioéster
Az-PEG12-DKTHT	$C_{69}H_{98}O_{23}N_{12}S$	1375,55	1376,26	Azida-PEG12-DKTHT-tioéster
Az-PEG24-DKTHT	$C_{93}H_{146}O_{35}N_{12}S$	1904,18	1904,80	Azida-PEG24-DKTHT-tioéster
Az-PEG36-DKTHT	$C_{107}H_{194}O_{47}N_{12}S$	2432,82	2434,40	Azida-PEG36-DKTHT-tioéster
Alk-PEG12	$C_{53}H_{74}O_{15}N_2S$	1011,22	1011,80	DIBAC-PEG12-tioéster

Mr, masa molecular relativa; MH+, valor de masa monoisotípico.

Tabla 2. Unión a TNF-α medida mediante resonancia de plasmón superficial

Ligando unido a superficie	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (M)	Rmax1	ka2 (1/Ms)	kd2 (1/s)	KD2 (M)	Rmax2	Chi²
TNR1B-Alk-Az-DKTHT-Fc6	1,252E+7	0,003744	2,990E-10	2,5	5,176E+6	0,03392	6,553E-9	3,9	0,0514
TNR1B-Alk-Az-PEG_4-DKTHT-Fc6	1,400E+7	0,002613	1,866E-10	3,0	5,129E+6	0,03021	5,890E-9	4,8	0,0503

Abreviaturas: ka, velocidad de asociación (medida); kd, velocidad de disociación (medida; K_D, constante de disociación (calculada).

EJEMPLO 2: Fab'-alquino-azida-Fc6

Se preparó Fab'-alquino-azida-Fc6 mediante la reacción de Fab' modificado con cicloalquino con Fc6 modificado con azida de la siguiente manera.

Se obtuvo adalimumab (Humira) como formulación líquida (50 mg/ml) de Abbott (Abbott Park, IL). Se preparó el fragmento Fab' usando proteasa IdeS para generar en primer lugar fragmento Fab'2 seguido por reducción selectiva de los disulfuros entre cadenas con 2-mercaptoetilamina (figura 13). Se sometió el anticuerpo (10 mg) a intercambio en tampón de escisión (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,6) usando una unidad de diálisis Slide-A-Lyzer Mini, MWCO de 10 K de Pierce (Rockford, IL), después se incubó con IdeS recombinante marcado con etiqueta de his inmovilizado sobre perlas de agarosa (columna FragIT MidiSpin) de Genovis (Lund, Suecia) durante 1 hora a temperatura ambiente con mezclado constante. Se retiraron las perlas de la disolución de digestión mediante centrifugación, se lavaron dos veces con tampón de escisión y después se combinaron las disoluciones de digestión y de lavado y se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap HP de GE Life Sciences (Piscataway, NJ) para retirar el fragmento Fc' y anticuerpo sin digerir. Se redujeron fracciones de flujo a través que contenían el fragmento Fab'2 para dar el fragmento Fab' añadiendo alícuotas de 1 ml a un vial que contenía 6 mg de 2-mercaptoetilamina (MEA) de Pierce. Se llevaron a cabo reducciones con EDTA 10 mM para minimizar la reoxidación de los disulfuros entre cadenas. Tras la incubación a 37ºC durante 110 min, se retiró el MEA en exceso mediante intercambio de tampón en PBS que contenía EDTA 10 mM usando una columna de desalación PD-10 de GE Life Sciences (Piscataway, NJ). Se concentró el eluato que contenía el fragmento Fab' usando una unidad de filtro de centrífuga Amicon Ultracel-3 de Millipore (Billerica, MA).

La figura 14 muestra el análisis mediante SDS-PAGE de adalimumab tras la escisión con IdeS (panel A), seguido por cromatografía de proteína A y reducción leve con MEA (panel B). En presencia de un fuerte agente reductor (ditiotreitol) en el gel de poliacrilamida, el anticuerpo completo (carril 1) migró como una cadena pesada de Mr ~55.000 (flecha a) y una cadena ligera de Mr ~25.000 (flecha d). IdeS escindió la cadena pesada (carril 2) para dar un fragmento C-terminal de Mr ~29.000 (flecha b) y un fragmento N-terminal de Mr ~26.000 (flecha c). La cadena ligera y el fragmento de cadena pesada N-terminal comprenden el dominio Fab'2, mientras que el fragmento de cadena pesada C-terminal comprende el dominio Fc'. La columna de proteína A retiró eficazmente el dominio Fc' a partir del dominio Fab' (compárense el carril 2 con los carriles 5 y 6). En condiciones no reductoras, el dominio Fab'2 migró como una única especie de Mr ~110.000 (carril 3), mientras que el dominio Fab' produjo una leve reducción con MEA que migró como una única especie de Mr ~55.000 (carril 4). En condiciones reductoras, el dominio Fab'2 (carril 5) y el dominio Fab' (carril 6) proporcionaron ambos la misma cadena ligera (flecha d) y fragmento de cadena pesada N-terminal (flecha c), tal como se esperaba. Por tanto, el dominio Fab' obtenido mediante este procedimiento estaba esencialmente libre de los dominios Fab'2 y Fc'.

Se preparó Fab' modificado con cicloalquino a partir del dominio Fab' de adalimumab usando un grupo de unión bifuncional, DIBAC-PEG_{12}-Lys(Mal), que contiene un grupo maleimida que puede reaccionar con los grupos tiol libres en el fragmento Fab' (figura 15). Se preparó DIBAC-PEG_{12}-Lys(Mal) usando una estrategia de síntesis en fase sólida de Fmoc. Se obtuvieron resina Lys(Mtt)-Wang y 3-maleimidopropanoato de succinimido (Mpa-OSu) de CPC Scientific (Sunnyvale, CA), se obtuvo Fmoc-*N*-amido-dPEG_{12}-ácido de Quanta BioDesign (Powell, OH), y se sintetizó ácido 5-(11,12-dideshidrodibenzo[*b*,*f*]azocin-5(6*H*)-il)-5-oxopentanoico, un aza-dibenzociclooctino funcionalizado con ácido (DIBAC-ácido), tal como se describe por Debets, M. F. *et al.*, Chem. Commun. 46, 97-99 (2010). Se hicieron reaccionar Fmoc-*N*-amido-dPEG_{12}-ácido y DIBAC-ácido de manera secuencial con resina Lys(Mtt)-Wang para obtener resina DIBAC-PEG_{12}-Lys(Mtt)-Wang, después se trataron con TFA/DCM/TIS (1:96:3) para retirar el grupo Mtt. Se hizo reaccionar la resina desprotegida con Mpa-OSu en el grupo amino libre en la cadena lateral de lisina para obtener resina DIBAC-PEG_{12}-Lys(Mpa)-Wang. Tras la escisión con TFA/agua (95:5), se purificó el producto bruto mediante RP-HPLC preparativa para producir el producto DIBAC-PEG_{12}-Lys(Mal) (DPKM) con una pureza del 93% y los espectros de EM deseados.

La figura 16 muestra la modificación química de fragmento Fab' de adalimumab con el grupo de unión DIBAC-PEG_{12}-Lys(Mal) y la purificación del Fab' modificado con cicloalquino resultante. Para la purificación, se llevaron a cabo reacciones (0,535 ml) en fosfato de sodio 0,1 M a pH 7,0 y pH 7,4, que contenían cada una 5 mg de fragmento Fab' y 10 mg de DIBAC-PEG_{12}-Lys(Mal). Después de una incubación de 30 horas a temperatura ambiente, se combinaron las dos reacciones y se sometieron a intercambio de tampón en acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, pH 5,5 usando una columna PD-10. Se aplicó el eluato (3,5 ml) a una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP de GE Life Sciences que retenía la totalidad de Fab' sin modificar y Fab'2 residual. Se combinaron las fracciones de flujo a través (5,5 ml) que contenían el Fab' modificado con cicloalquino purificado (figura 16b), se ajustaron a pH 7,0 con 10x PBS (0,55 ml), y se concentraron mediante cromatografía de afinidad en una columna de proteína L (Capto L) de GE Life Sciences. Se eluyó el Fab' modificado con cicloalquino a partir de la columna de proteína L con glicina·HCl 0,1 M pH 2,7 (2,4 ml), se neutralizó con 1/20 volumen de Tris HCl 1,0 M pH 9,0, se sometió a intercambio de tampón en PBS usando una columna PD-10 (3,5 ml) y se concentró usando una unidad de filtro de centrífuga Amicon Ultracel-3 hasta un volumen final de 70 ul a una concentración de 9,5 mg/ml.

Se usaron diversas proteínas de Fc6 modificado con azida con grupos de unión de PEG de diferentes longitudes en la preparación del Fab' de adalimumab-cicloalquino-azida-Fc6. Se prepararon Az-DKTHT-Fc6 (figura 3) y derivados de Az-DKTHT-PEG_x-Fc6 con x = 12, 24 y 36 (figura 4) en reacciones (2 ml) que contenían MES 50 mM pH 6,5, TCEP

0,8 mM, MPAA 10 mM, 5 mg/ml de cada uno de los cuatro Az-DKTHT-PEG_x-tioésteres, y 2,36 mg/ml de proteína Fc6. Después de 20 horas a temperatura ambiente, se neutralizaron las reacciones con 100 ul de Tris HCl pH 9,0, se aclararon mediante centrifugación a 12.000xg, y se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap HP de 1 ml. Se lavaron las columnas con 12 vol de PBS, después se eluyeron las proteínas de Fc6 modificado con azida con glicina·HCl 0,1 M pH 2,7 (2,0 ml), se neutralizaron con 1/20 volumen de Tris HCl 1,0 M pH 9,0, se dializaron frente a tres cambios de PBS durante 12 horas cada uno usando una unidad de diálisis Slide-A-Lyzer Mini, MWCO de 10 K, y se concentraron usando unidades de filtro de centrífuga Amicon Ultracel-3.

La figura 17 muestra el análisis mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras de las proteínas Fc6 (carril 1), Az-DKTHT-Fc6 (carril 2), Az-DKTHT-PEG_{12}-Fc6 (carril 3), Az-DKTHT-PEG_{24}-Fc6 (carril 4), y Az-DKTHT-PEG_{36}-Fc6 (carril 5) mediante SDS-PAGE. La proteína Fc6 reaccionó de manera cuantitativa (> 90%) con los cuatro tioésteres, proporcionando una escalera de productos de tamaño creciente.

La figura 18 muestra el análisis mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) para confirmar que los cuatro productos de proteína de Fc6 modificado con azida tenían la misma estructura dimérica que la molécula de Fc6 original. Se llevó a cabo SEC usando un sistema Prominence HPLC (Shimadzu Corp, Kioto, Japón). Se obtuvieron columnas TSKgel Super SW3000 (columna de 4,6 mm x 30 cm, precolumna de 4,6 mm x 5 cm) de TOSOH Bioscience (Tokio, Japón). La fase móvil, velocidad de flujo, temperatura de columna y longitud de onda de detección usadas fueron fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,4, 0,35 ml/min, 30ºC y 280 nm, respectivamente. Los cuatro productos de proteína de Fc6 modificado con azida presentaron un tiempo de retención que disminuyó a medida que aumentó el tamaño de grupo de unión de PEG, confirmando su estructura de dímero. Los cuatro productos también dieron esencialmente un único pico, demostrando una estructura de dos manos en la que ambos extremos N-terminales del dímero de Fc6 original se modificaron mediante el grupo de unión de PEG que se confirmó mediante análisis mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras (véase a continuación).

Se hizo reaccionar el Fab' modificado con ciclooctino con las cuatro moléculas de Fc6 modificado con azida (figura 19), proporcionando una familia de estructuras de Fab'-PEG_y-cicloalquino-azida-PEG_x-Fc6 con brazos de longitud creciente (figura 20). Las longitudes globales de los brazos resultantes eran de Fab'-PEG_{12}-Fc6 (para x = 0, y = 12), Fab'-PEG_{24}-Fc6 (para x = 12, y = 12), Fab'-PEG_{36}-Fc6 (para x = 24, y = 12), y Fab'-PEG_{48}-Fc6 (para x = 36, y = 12). Se llevaron a cabo las reacciones (8 ul) en fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0 durante la noche a temperatura ambiente con cada una de las cuatro proteínas de Fc6 modificado con azida (2,5 mg/ml) en presencia o ausencia del Fab' modificado con cicloalquino (5 mg/ml).

La figura 21 muestra el análisis mediante SDS-PAGE de la reacción de Fab'-cicloalquino-azida-Fc6 en condiciones reductoras y no reductoras. En ausencia del Fab' modificado con cicloalquino (carriles 5, 7, 9 y 11), las cuatro proteínas de Fc6 modificado con azida dieron una única banda en geles tanto reductores como no reductores, confirmando su estructura de dos manos dimérica. En presencia del Fab' modificado con cicloalquino (carriles 4, 6, 8 y 10), las cuatro proteínas de Fc6 modificado con azida se consumieron en gran medida en la reacción resultante. En condiciones reductoras, las cuatro reacciones dieron un producto con Mr ~de 57.000 a 62.000 (flecha a). El tamaño del producto Fab'-PEG_{12}-Fc6 (carril 4) era aproximadamente 1-2 kD mayor que la cadena pesada de adalimumab silvestre (carril 1), mientras que los tamaños de los productos de Fab'-PEG_{24}-Fc6 (carril 6), Fab'-PEG_{36}-Fc6 (carril 8) y Fab'-PEG_{48}-Fc6 (carril 10) aumentaron adicionalmente con la longitud global del grupo de unión de PEG. En condiciones no reductoras, se observaron dos productos, un primer producto de Mr ~ de 155.000 a 160.000 (flecha a), y un segundo de Mr ~ de 110.000 a 115.000 (flecha b). El producto de Fab'-PEG_{12}-Fc6 más grande (carril 4) era aproximadamente 5 kD mayor que el anticuerpo completo de adalimumab (carril 1), de manera compatible con el producto de dos manos esperado, mientras que los productos de Fab'-PEG_{24}-Fc6 (carril 6), Fab'-PEG_{36}-Fc6 (carril 8) y Fab'-PEG_{48}-Fc6 (carril 10) más grandes aumentaron todavía más de tamaño a medida que aumentaba la longitud global del grupo de unión de PEG.

La figura 22 muestra el análisis mediante SEC para confirmar la estructura de dos manos (es decir, dos manos de Fab' unidas a un dominio Fc6) del producto de reacción más grande con Mr ~ de 155.000 a 160.000 de las reacciones de Fab'-PEG_{12}-Fc6, Fab'-PEG_{24}-Fc6, Fab'-PEG_{36}-Fc6 y Fab'-PEG_{48}-Fc6. Los cuatro productos de reacción presentaron un tiempo de retención más corto que el anticuerpo completo de adalimumab que disminuyó adicionalmente a medida que aumentó el tamaño del grupo de unión de PEG, confirmando la estructura de dos manos observada mediante análisis mediante SDS-PAGE.

La actividad biológica de los productos de Fab'-cicloalquino-azida-Fc6 evaluada mediante su capacidad para neutralizar la citotoxicidad mediada por TNF-α en células WEHI murinas tratadas con actinomicina D. La línea celular WEHI-13VAR de ratón (ATCC CRL-2148) se obtuvo a partir de la colección americana de cultivos tipo (Rockville, MD) y se hizo crecer en medios 1640 RPMI de Gibco (RPMI-1640) complementados con suero bovino fetal (FBS) al 10% y penicilina y estreptomicina (10 U/ml), obtenidos de Life Technologies (Grand Island, NY). Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad de TNF-α de la siguiente manera. Se sembraron células WEHI-13VAR en placas de cultivo celular blancas Nunc de 96 pocillos obtenidas de Thermo Fisher (Waltham, MA) a $2x10^4$ células por pocillo durante la noche y después se trataron con actinomicina D (0,5 μg/ml) obtenida de Sigma (St Louis, MO) y TNF-α (0,2 ng/ml) en ausencia o presencia de TNFR-IgG u otros inhibidores. Después de 24 h de incubación a 37ºC/CO_2 al 5%, se determinó la viabilidad celular con sistemas de ensayo de viabilidad celular luminiscentes CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) que miden la cantidad de ATP presente en células metabólicamente activas y la luminiscencia medida

usando un luminómetro POLARstar (BMG LABTECH Inc., Cary, NC). Se diluyó cada inhibidor mediante diez diluciones en serie de 3 veces comenzando a 10 μg/ml y se midieron por duplicado o triplicado. Se calcularon datos de citotoxicidad usando las siguientes ecuaciones: (1 – lectura de luciferasa de muestra / lectura de luciferasa de células tratadas con actinomicina D sola) x 100%, y se presentaron como la media ± desviación estándar. Se usó Enbrel como control positivo de citotoxicidad y Fc6 como control negativo.

La figura 23 muestra la neutralización de la citotoxicidad mediada por TNF-α mediante mezclas de reacción de Fab'-PEG_{12}-Fc6, Fab'-PEG_{24}-Fc6, Fab'-PEG_{36}-Fc6 y Fab'-PEG_{48}-Fc6 en comparación con el Fab' modificado con cicloalquino (basándose en cantidades iguales de Fab' modificado con cicloalquino de entrada). Ambas mezclas de reacción de Fab'-PEG_{12}-Fc6 y Fab'-PEG_{24}-Fc6 presentaron actividad de neutralización de TNF-α comparable en comparación con la del Fab' modificado con cicloalquino de entrada (panel superior), mientras que las mezclas de reacción de Fab'-PEG_{36}-Fc6 y Fab'-PEG_{48}-Fc6 presentaron un aumento de 1,5 veces y 2,0 veces, respectivamente, en su actividad de neutralización de TNF-α en comparación con el Fab' modificado con cicloalquino de entrada (panel inferior). Dado que la cantidad de producto de dos manos representó únicamente el 10-20% del Fab' modificado con cicloalquino total en cada reacción tal como se estima mediante SDS-PAGE (figura 22), se estima que los productos de dos manos de las reacciones de Fab'-PEG_{36}-Fc6 y Fab'-PEG_{48}-Fc6 son al menos 7,5 veces y 10 veces mayores que el Fab' modificado con cicloalquino de entrada, respectivamente.

EJEMPLO 3: Fab-alquino-azida-Fc6

Se prepara Fab-alquino-azida-Fc6 haciendo reaccionar Fc6 modificado con azida con una proteína de Fab modificado con alquino o modificado con cicloalquino que se produce mediante escisión de una proteína de fusión de Fab-inteína de la siguiente manera. De manera similar, se prepara Fab-azida-alquino-Fc6 haciendo reaccionar Fc6 modificado con alquino o modificado con cicloalquino con una proteína de Fab modificado con azida que se produce mediante escisión de una proteína de fusión de Fab-inteína.

Se produce proteína de fusión de Fab de adalimumab-inteína cotransfectando vector de expresión pFUSE2ss-DE27-Vκ-CLIg-hk (SEQ ID NO: 115) con pPUSEss-DE27-Vγ1-CHIg-hG1-Mth-1 (SEQ ID NO: 116) o pFUSEss-DE27-Vγ1-CHIg-hG1-Mth-2 (SEQ ID NO: 117).

El vector pFUSE2ss-DE27-Vκ-CLIg-hk dirige la expresión de la cadena ligera pre-kappa de adalimumab mostrada en SEQ ID NO: 118. La escisión de la secuencia señal de IL-2 heteróloga mediante la señal peptidasa celular proporciona la cadena ligera kappa madura de adalimumab mostrada en SEQ ID NO: 119.

El vector pFUSEss-DE27-Vγ1-CHIg-hG1-Mth-1 dirige la expresión de un primer tipo de polipéptido quimérico de pre-cadena pesada-inteína mostrado en SEQ ID NO: 120, en el que los dominios VH y CH1 de cadena pesada de adalimumab están unidos en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de una inteína de autoempalme RIR1 en el sitio de autoescisión. La escisión de la secuencia señal de IL-2 heteróloga mediante la señal peptidasa celular proporciona la proteína de fusión de cadena pesada-inteína madura mostrada en SEQ ID NO: 121. En conjunto, las proteínas de SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 121 comprenden la proteína de fusión de Fab-1 de adalimumab-inteína que se secreta en el líquido de cultivo celular.

El vector pFUSEss-DE27-Vh1-CHIg-hG1-Mth-2 dirige la expresión de un segundo tipo de polipéptido quimérico de pre-cadena pesada-inteína mostrado en SEQ ID NO: 122, en el que los dominios VH y CH1 de cadena pesada de adalimumab están unidos en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de una inteína de autoempalme RIR1 en el sitio de autoescisión. La escisión de la secuencia señal de IL-2 heteróloga mediante la señal peptidasa celular proporciona la proteína de fusión de cadena pesada-inteína madura mostrada en SEQ ID NO: 123. En conjunto, las proteínas de SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 123 comprenden la proteína de fusión de Fab-2 de adalimumab-inteína que se secreta en el líquido de cultivo celular.

Se lleva a cabo la producción de proteína mediante expresión transitoria en células CHO-DG44 esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1, mediante la cotransfección de SEQ ID NO: 115 con SEQ ID NO: 116 para producir la proteína de fusión de Fab-1 de adalimumab-inteína, y mediante cotransfección de SEQ ID NO: 115 con SEQ ID NO: 117 para producir la proteína de fusión Fab-2 de adalimumab-inteína.

Se producen proteínas de Fab modificado con alquino de adalimumab mediante escisión de proteínas de fusión de Fab de adalimumab-inteína con cistil-propargilamida 50 mM esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1. Se escinde la proteína de fusión de Fab-1 de adalimumab-inteína con cistil-propargilamida para producir proteína de Fab-1modificado con alquino de adalimumab que es una proteína de heterodímero de SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 124. Se escinde la proteína de fusión de Fab-2 de adalimumab-inteína con cistil-propargilamida para producir proteína de Fab-2 modificado con alquino de adalimumab que es una proteína de heterodímero de SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 125.

Se producen proteínas de Fab modificado con azida de adalimumab mediante escisión de proteínas de fusión de Fab de adalimumab-inteína con cistil-3-azidopropilamida 50 mM esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1. Se escinde la proteína de fusión de Fab-1 de adalimumab-inteína con cistil-3-azidopropilamida para producir proteína de Fab-1 modificado con azida de adalimumab que es una proteína de heterodímero de SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO:

126. Se escinde la proteína de fusión de Fab-2 de adalimumab-inteína con cistil-3-azidopropilamida para producir proteína de Fab-2 modificado con azida de adalimumab que es una proteína de heterodímero de SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 127.

Se preparan Fab-1 de adalimumab-alquino-azida-Fc6 y Fab-2 de adalimumab-alquino-azida-Fc6 mediante la reacción de proteína de Fab-1 modificado con alquino de adalimumab o proteína de Fab-2 modificado con alquino de adalimumab con proteína Az-DKTHT-Fc6 (figura 6) o proteínas Az-PEG_x-DKTHT-Fc6 (figura 7).

Se prepara tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THTPA) tal como se describe por Hong *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 48, 1-7 (2009). Se llevan a cabo las reacciones en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0, con el grupo de unión-Fc a una concentración de 5 mg/ml o mayor, y una razón molar de > 2:1 de Fab-A:grupo de unión-Fc. A la reacción se le añade una concentración final de $CuSO_4$ 0,0001 M, THTPA 0,0005 M. Se inicia la reacción añadiendo hasta una concentración final de aminoguanidina 0,005 M y ascorbato de sodio 0,005 M. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 12-18 horas en un tubo cerrado, se aplica la mezcla de reacción a una columna cromatográfica empaquetada con proteína A (GE Lifesciences, NJ) para retirar el reactivo en exceso y Fab-A sin reaccionar, se lava con PBS, se eluye con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7, y se neutraliza inmediatamente añadiendo Tris-HCl 1,0 M, pH 9,0. Se dializan los productos de Fab-1 de adalimumab-alquino-azida-Fc6 y Fab-2 de adalimumab-alquino-azida-Fc6 eluidos frente a PBS.

Se preparan Fab-1 de adalimumab-azida-alquino-Fc6 y Fab-2 de adalimumab-azida-alquino-Fc6 mediante la reacción de proteína de Fab-1 modificado con azida de adalimumab o proteína de Fab-2 modificado con azida de adalimumab con proteína de Fc6 modificado con cicloalquino.

Se preparan proteínas de Fc6 modificado con cicloalquino esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1 usando DIBAC-PEG_{12}-tioéster (tabla 1) y otros DIBAC-PEG_x-tioésteres y DIBAC-PEG_x-DKTHT-tioésteres preparados de manera similar.

Ejemplo 4: Proteínas de Fc modificado con azida N-terminales

Se preparó una serie de proteínas de Fc modificado con azida (N_3-Px-Fc), que tenían, cada una, un grupo funcional azida en su extremo N-terminal, y opcionalmente un grupo de unión de PEG, haciendo reaccionar la proteína Fc6 con cinco tioésteres que tenían la secuencia azidoacetil-Px-DKTHT-tiofenol (x = 0, 12, 24, 36, 48). Se llevaron a cabo las reacciones en ausencia de TCEP para minimizar cualquier reducción del grupo azida para dar una amina primaria. En la tabla 1 se muestran los tioésteres de azidoacetil-Px-DKTHT-tiofenol con x = 12, 24, 36. Se preparó azidoacetil-DKTHT-tiofenol tal como se describe en el ejemplo 1 (calculado para $C_{32}H_{45}O_{10}N_{11}S$ $[M+H]^+$ 776,8, hallado 776,3). Se preparó azidoacetil-PEG_{48}-DKTHT-tiofenol mediante fase sólida mediante la condensación secuencial de Fmoc-PEG_{12}-OH y Fmoc-PEG_{36}-OH obtenidos de Quanta BioDesign (calculado para $C_{134}H_{247}N_{13}O_{60}S$ $[M+H]^+$ 3032,5, hallado 3032,8). Las fórmulas estructurales son las siguientes:

Cada reacción (2 ml) contenía MES 50 mM pH 6,5, ácido mercaptofenilacético 10 mM, 2,2 mg de Fc6 y uno de los cinco tioésteres de la siguiente manera: azidoacetil-DKTHT-tiofenol (5 mg), azidoacetil-PEG_{12}-DKTHT-tiofenol (5 mg), azidoacetil-PEG_{24}-DKTHT-tiofenol (10 mg), azidoacetil-PEG_{36}-DKTHT-tiofenol (10 mg) o azidoacetil-PEG_{48}-DKTHT-tiofenol (20 mg). Se llevaron a cabo las reacciones durante 20 horas a temperatura ambiente, se neutralizaron con 0,1 ml de Tris HCl pH 9,0, se centrifugaron a 12.000 x g, y se aplicaron a una columna de proteína A HiTrap HP. Se lavaron las columnas con 12 vol de PBS, y después se eluyeron las proteínas de N_3-Px-Fc con glicina·HCl 0,1 M pH 2,7 y se neutralizaron con 1/20 volúmenes de Tris HCl 1,0 M pH 9,0. Se combinaron las fracciones de pico mediante A_{280}, se desalaron en columnas PD-10 y se concentraron usando unidades de filtro de centrífuga Amicon Ultracel-3.

La figura 24 muestra las proteínas purificadas de N_3-Px-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), N_3-P0-Fc (carriles b), N_3-P12-Fc (carriles c), N_3-P24-Fc (carriles d), N_3-P36-Fc (carriles e), y N_3-P48-Fc (carriles f). El tamaño de las proteínas de N_3-Px-Fc aumentó con la longitud del grupo de unión de PEG. Además, el tamaño de las proteínas de N_3-Px-Fc preparadas sin TCEP (figura 24) no pudieron distinguirse mediante SDS-PAGE con respecto al tamaño de las proteínas de N_3-Px-Fc preparadas con TCEP (figura 17).

Ejemplo 5: inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc

Se preparó una serie de inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc (GLP1-P4-DN-Px-Fc) haciendo reaccionar un análogo de GLP-1 (péptido similar al glucagón 1), modificado adicionalmente para tener un grupo funcional ciclooctino, con cada una de las cinco proteínas de N_3-Px-Fc del ejemplo 4. La secuencia del análogo de GLP-1, HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG-PEG_3-C-NH_2 (HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG es SEQ ID NO: 202), corresponde a los residuos 7-37 del péptido de GLP-1 nativo, en el que se sustituye glicina por alanina en la posición 8 y se sustituye ácido glutámico por lisina en la posición 22. Además, el análogo de GLP-1 tiene un grupo de grupo de unión de PEG_3 y residuo de cisteína en su extremo C-terminal usado para unir el grupo funcional ciclooctino. Este análogo de GLP-1, gly8-glu22-GLP-1(7-37)-PEG_3-cys-NH_2, se preparó mediante SPPS (calculado para $C_{165}H_{253}N_{43}O_{53}S$ $[M+H]^+$ 3720,3, hallado 3721,3).

Se añadió un grupo funcional ciclooctino a gly8-glu22-GLP-1(7-37)-PEG_3-cys-NH_2 usando un grupo de unión

heterobifuncional, DBCO-PEG_4-maleimida, que contenía un grupo maleimida que podía reaccionar con el grupo tiol libre en el residuo de cisteína C-terminal (figura 25). Se obtuvo DBCO-PEG_4-maleimida ($C_{50}H_{54}N_4O_9$, peso molecular de 854,92), de Click Chemistry Tools (Scottsdale, AZ). Antes de su uso, se disolvió el grupo de unión a una concentración de 25 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las reacciones (0,4 ml) contenían MES 50 mM pH 6,5, EDTA 5 mM, 0,45 mg de péptido gly8-glu22-GLP-1(7-37)-PEG_3-cys-NH_2 y 0,9 mg/ml del grupo de unión DBCO-PEG_4-maleimida. Se llevaron a cabo las reacciones durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el grupo de unión sin reaccionar en exceso usando una columna de desalación HiTrap de 5 ml obtenida de GE Life Sciences. La figura 25 muestra la estructura del producto de reacción de análogo de GLP-1 modificado con ciclooctino resultante (GLP1-P7-DBCO).

Se hizo reaccionar GLP1-P7-DBCO de manera individual con cada una de las cinco proteínas de N_3-Px-Fc (figura 26), para generar una serie de inmunoglobulinas híbridas de GLP1-P7-triazol-Px-Fc (figura 27). Cada reacción (1,5 ml) contenía fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 0,375 mg del péptido GLP1-P7-DBCO y 0,5 mg de una de las cinco proteínas de N_3-Px-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones durante 3,5 horas a temperatura ambiente, se purificaron las reacciones mediante cromatografía de proteína A HiTrap HP, se desalaron y se concentraron tal como se describe en el ejemplo 4.

La figura 28 muestra las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc purificadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y condiciones no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), GLP1-P4-DN-P0-Fc (carriles b), GLP1-P4-DN-P12-Fc (carriles c), GLP1-P4-DN-P24-Fc (carriles d), GLP1-P4-DN-P36-Fc (carriles e), y GLP1-P4-DN-P48-Fc (carriles f). El tamaño de las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc aumentó con la longitud del grupo de unión de PEG de manera comparable a las proteínas de N_3-Px-Fc.

La figura 29 compara directamente las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc y las proteínas de N_3-Px-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: control de Fc6 (carril a), N_3-P0-Fc (carril b), GLP1-P4-DN-P0-Fc (carril c), N_3-P12-Fc (carril d), GLP1-P4-DN-P12-Fc (carril e), N_3-P24-Fc (carril f), GLP1-P4-DN-P24-Fc (carril g), N_3-P36-Fc (carril h), GLP1-P4-DNP36-Fc (carril i), N_3-P48-Fc (carril j), GLP1-P4-DN-P48-Fc (carril k). La conversión de cada proteína de N_3-Px-Fc en la inmunoglobulina híbrida de GLP1-P4-DN-Px-Fc correspondiente fue de aproximadamente el 95%.

Ejemplo 6: Actividad biológica de inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc

Se evaluó la actividad biológica de las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-P7-triazol-Px-Fc en un ensayo basado en células que midió la inducción de la síntesis de cAMP en células que expresaban el receptor de GLP-1 humano (GLP-1R). Para el aislamiento de células que expresaban GLP-1R, se obtuvieron medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de Invitrogen (Grand Island, NY), suero bovino fetal (FBS), penicilina, estreptomicina y sulfato de geneticina (G418) de Corning (Manassas, VA), se obtuvo el kit de transfección de CalPhos de Clontech (Mountain Vista, CA), se obtuvo plásmido de expresión de receptor de GLP-1 humano de GeneCopoeia (Rockville, MD), y se obtuvo anticuerpo monoclonal anti-GLP-1R humano-ficoeritrina de R&D Systems (Mineápolis, MN). Para ensayos de cAMP, se obtuvo 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) de Sigma-Aldrich (n.º 15879), se obtuvo el kit de cAMP dinámico 2 de Cisbio Bioassays (Bedford, MA) y se obtuvo el péptido GLP-1(7-37) de AnaSpec (n.º 20761).

Se prepararon células que expresaban GLP-1R mediante transfección de un vector de expresión de GLP-1R (EX-A0510-M02) en células de riñón embrionario 293T humanas usando un kit de transfección de mamífero CalPho. Se hicieron crecer células transfectadas en DMEM complementado con FBS al 10% y penicilina y estreptomicina (10 UI/ml) y se llevó a cabo la selección de transfectantes estables en los mismos medios que contenían G418 2 mg/ml. Se evaluó la expresión de GLP-1R mediante análisis de citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal anti-GLP-1R humano-ficoeritrina.

Para ensayos de cAMP, se sembraron células 293T-GLP-1R durante la noche en placas de microtitulación blancas tratadas con cultivo tisular de 384 pocillos (Corning n.º 3704) a una densidad de 5.000, 8.000 o 10.000 células/pocillo en 20 ul de medio/pocillo. Al día siguiente, se añadieron diluciones en serie de agonista (péptido GLP-1 o las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc) en 20 ul de PBS que contenían IBMX 0,5 mM a las células, y después se incubaron las células a 37ºC durante 1, 4 o 24 horas. Tras la estimulación, se determinaron los niveles de cAMP mediante fluorescencia de resolución en el tiempo homogénea (HTRF) en un lector de microplacas ClarioStar (BMG Labtech) usando un kit de cAMP dinámico 2 de Cisbio según las instrucciones del fabricante. Tras la adición de reactivos de detección de HTRF, AcM anti-cAMP marcado con criptato (20 ul) y el cAMP marcado con colorante d2 (20 ul), se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente y se calculó la razón de fluorescencia (665 nm/620 nm) y se usó para determinar la concentración de cAMP en los lisados celulares mediante ajuste de cuatro parámetros a una curva patrón de cAMP.

La figura 30 muestra los resultados de péptido GLP-1(7-37) y las proteínas de GLP1-P7-DN-Px-Fc (x = 0, 12, 24, 36, 48). Las cinco inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc indujeron niveles de cAMP comparables al péptido GLP-1(7-37). La estimulación mediante GLP-1(7-37) fue similar ya se expusieran las células a agonista durante 1, 4 o 24 horas, con una CE_{50} de ~2 nM a las 24 horas, mientras que la estimulación mediante las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-triazol-Fc aumentó drásticamente a medida que se expusieron las células a agonista durante tiempos más prolongados, con una CE_{50} de ~0,4 nM a las 24 horas.

Ejemplo 7: Proteínas de ciclooctino-Fc N-terminales

Se prepara una serie de proteínas de Fc modificado con ciclooctino (DIBAC-P11-DN-Px-Fc), que tienen cada una un grupo funcional ciclooctino en su extremo N-terminal, haciendo reaccionar un grupo de unión ciclooctino homobifuncional con las proteínas de N_3-Px-Fc modificado con azida del ejemplo 4. El grupo de unión, DIBAC-PEG_{11}-DIBAC, mostrado en la figura 31, se obtuvo de CPC Scientific (calculado para $C_{74}H_{102}N_6O_{17}$ $[M+H]^+$ 1346,6, hallado 1346,4). La porción PEG_{11} de este grupo de unión se derivó de diamido-dPEG_{11}-diamina (Quanta Biodesigns n.º 10361) que tiene la estructura: [-NH-CH_2-(CH_2-CH_2-O)$_3$-(CH_2)$_3$-CO-NH-(CH_2-CH_2-O)$_5$-(CH_2)$_2$-CO-NH-CH_2-(CH_2-CH_2-O)$_3$-(CH_2)$_3$-NH-].

Se hace reaccionar DIBAC-PEG_{11}-DIBAC de manera individual con cada una de las cinco proteínas de N_3-Px-Fc (figura 31), para generar una serie de proteínas de DIBAC-P11-DN-Px-Fc (figura 32). Se muestran resultados representativos para la reacción de DIBAC-PEG_{11}-DIBAC con la proteína N_3-P0-Fc para generar DIBAC-P11-DN-P0-Fc. Se inició la reacción (1 ml) añadiendo 84 mg de la proteína de N_3-Px-Fc a 11,25 mg del grupo de unión de DIBAC-PEG_{11}-DIBAC en fosfato de sodio 0,02 M pH 7,0 en agua-etanol (0,64:0,36 vol/vol). Se llevó a cabo la reacción durante 12 horas a temperatura ambiente, y después se extrajo el grupo de unión de DIBAC-PEG_{11}-DIBAC añadiendo 1 ml de PBS, mezclando bien y centrifugando a 12.000 x g lo cual separó el grupo de unión como una fase aceitosa más densa. El producto DIBAC-P11-DN-P0-Fc deseado contenido dentro de la fase acuosa superior se purificó mediante cromatografía de proteína A HiTrap HP, se desaló y se concentró tal como se describe en el ejemplo 4.

La figura 33 muestra el producto de reacción DIBAC-P11-DN-P0-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: control de Fc6 (carril b), producto de reacción sin purificar (carriles c-e), la proteína N3-P0-Fc purificada (carril f), y la proteína DIBACP11-DN-P0-Fc purificada (carril g). Aproximadamente, el 70% de la proteína N_3-P0-Fc (I) se convirtió en un producto que tenía el tamaño esperado de la proteína DIBAC-P11-DN-P0-Fc (II).

Ejemplo 8: inmunoglobulinas híbridas de ADN-triazol-Fc

Se prepara una serie de inmunoglobulinas híbridas de ADN-triazol-Fc (ADN-P11-DN-Px-Fc) haciendo reaccionar un ADN o ARN modificado con azida, con cada una de las cinco proteínas de DIBAC-P11-DN-Px-Fc del ejemplo 7. La figura 34 muestra la estructura del ADN modificado con azida, 5AzD-let7d, que tiene la secuencia 5'-AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT-3' (SEQ ID NO: 203) de la cadena codificante de ADN para el ARNmi de hsa-let-7d-5p humano maduro (www.mirbase.org, n.º de registro MIMAT0000065). Se obtuvo el oligonucleótido 5AzD-let7d (5AzD-let7d) de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Antes de su uso, se disolvió 5AzD-let7d (peso molecular de 7187,8) en Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM.

Se hizo reaccionar 5AzD-let7d de manera individual con cada una de las proteínas de DIBAC-P11-DN-Px-Fc (figura 34) para generar una serie de inmunoglobulinas híbridas de ADN-triazol-Fc (figura 35). Se muestran resultados representativos para la reacción de 5AzD-let7d con la proteína DIBAC-P11-DN-P0-Fc. Las reacciones (20 ul) contenían fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 50 ug de 5AzD-let7d o una serie de diluciones de dos veces del mismo, y 5,7 ug de la proteína de ADN-P11-DN-Px-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 2 horas.

La figura 36 muestra los productos de reacción mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: la concentración de oligonucleótido 5AzD-let7d (mg/ml) fue de la siguiente manera: marcadores (carril a), 0 (carril b), 2,5 (carril c), 1,25 (carril d), 0,063 (carril e), 0,031 (carril f), 0,016 (carril g), 0,08 (carril h). Aproximadamente el 90% de la proteína DIBAC-P11-DN-P0-Fc (II) se convirtió en un producto que tenía el tamaño esperado de la inmunoglobulina híbrida ADN-ND-P11-DN-PEG_0-Fc (III).

Ejemplo 9: Proteínas de azida-AcM N-terminales

Se prepara una serie de proteínas de trastuzumab modificado con azida (N_3-Px-Hc), que tienen cada una un grupo funcional azida en el extremo N-terminal de su cadena pesada, y opcionalmente un grupo de unión de PEG, haciendo reaccionar una variante de proteína de trastuzumab, cys1HIgG1, con tioésteres que tienen la secuencia azidoacetil-Px-DKTHT-tiofenol (figura 37).

Cys1H-IgG1 consiste en la cadena ligera de trastuzumab silvestre mostrada en SEQ ID NO: 128, y una cadena pesada de trastuzumab variante, que tiene en su extremo N-terminal de cadena pesada un residuo de cisteína. La cadena pesada de cys1H-IgG1 se expresa inicialmente como las pre-cadenas pesadas de trastuzumab variantes mostradas en SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168 y SEQ ID NO: 169, que tienen un péptido señal de SHH, péptido señal de IFN y péptido señal de CETP, respectivamente. La escisión de las secuencias señal heterólogas mediante la señal peptidasa celular proporciona la proteína de cadena pesada madura que tiene una cisteína N-terminal, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 166.

Se prepara una segunda serie de proteínas de trastuzumab modificado con azida (N_3-Px-Lc), que tienen cada una un grupo funcional azida en el extremo N-terminal de su cadena ligera, y opcionalmente un grupo de unión de PEG, haciendo reaccionar una variante de proteína de trastuzumab, cys1L-IgG1, con tioésteres que tienen la secuencia azidoacetil-Px-DKTHT-tiofenol (figura 38).

Cys1L-IgG1 consiste en la cadena pesada de trastuzumab silvestre mostrada en SEQ ID NO: 129, y una cadena ligera

de trastuzumab variante, que tiene en su extremo N-terminal de cadena pesada un residuo de cisteína. La cadena ligera de cys1L-IgG1 se expresa inicialmente como las pre-cadenas ligeras de trastuzumab variantes mostradas en SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132 y SEQ ID NO: 133 que tienen un péptido señal de SHH, péptido señal de IFN y péptido señal de CETP, respectivamente.

La escisión de las secuencias señal heterólogas mediante la señal peptidasa celular proporciona la proteína de cadena ligera madura que tiene una cisteína N-terminal, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 130.

Se cotransfectan vectores de expresión de cadena ligera y pesada apropiados para producir las proteínas cys1H-IgG1 y cysL-IgG. Se lleva a cabo la producción de proteínas mediante expresión transitoria en células CHO-DG44, adaptadas para el cultivo el suspensión libre de suero seguido por purificación con proteína A, tal como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 10: Inmunoglobulinas híbridas de mertansina-triazol-trastuzumab

Se prepara una serie de inmunoglobulinas híbridas de mertansina-triazol-trastuzumab haciendo reaccionar el maitansinoide DM1 (mertansina), modificado adicionalmente para tener un grupo funcional ciclooctino, con cada una de las proteínas de N_3-Px-Hc y N_3-Px-Lc del ejemplo 9.

Se prepara DM1 (forma de tiol libre; P.M. 737,5 g/mol) tal como se describió anteriormente en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.208.020 y 6.333.410 B1. Se añade un grupo funcional ciclooctino a DM1 usando el grupo de unión heterobifuncional DBCO-PEG_4-maleimida que contiene un grupo maleimida que puede reaccionar con el grupo tiol libre de DM1 (figura 39). Se hace reaccionar DM1 con DBCO-PEG_4-maleimida en DMSO usando los procedimientos del ejemplo 5. Se purifica el producto de DM1 modificado con cicloctino (DM1-P4-DBCO) mediante HPLC y se disuelve en DMSO antes de su uso.

Se hace reaccionar DM1-P4-DBCO de manera individual con cada una de las cinco proteínas de N_3-Px-Hc (figura 40), para generar una serie de inmunoglobulinas híbridas de mertansina-triazol-trastuzumab modificadas con DM1 en el extremo N-terminal de la cadena pesada de trastuzumab (DM1-P4-triazol-Px-Hc) (figura 41).

Se hace reaccionar DM1-P4-DBCO de manera individual con cada una de las cinco proteínas de N_3-Px-Lc (figura 42), para generar una serie de inmunoglobulinas híbridas de mertansina-triazol-trastuzumab modificadas con DM1 en el extremo N-terminal de la cadena ligera de trastuzumab (DM1-P4-triazol-Px-Lc) (figura 43).

Se evalúa la eficacia de las inmunoglobulinas híbridas de mertansina-triazol-trastuzumab como conjugados de anticuerpo-fármaco novedosos y se compara con ado-trastuzumab emtansina, obtenido de Genentech (South San Francisco, CA), usando ensayos de proliferación celular *in vitro* ensayos de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* tal como se describe en la patente estadounidense n.º 7.521.541B2.

Ejemplo 11 (según la invención): Proteínas de tetrazina-Fc N-terminales

Se preparó una serie de proteínas de Fc modificadas con tetrazina (Tet-Px-Fc), que tenían cada una un grupo tetrazina en su extremo N-terminal y opcionalmente un grupo de unión de PEG_x, haciendo reaccionar un grupo de unión heterobifuncional con las proteínas de N_3-Px-Fc modificado con azida del ejemplo 4. La figura 44 muestra el grupo de unión heterobifuncional tetrazina-DBCO, que tiene un grupo ciclooctino en un extremo que puede reaccionar con el grupo azida de las proteínas de N_3-Px-Fc, y un grupo tetrazina en el otro extremo. El grupo de unión tetrazina-DBCO se obtuvo de Click Chemistry Tools (artículo n.º 1022; $C_{32}H_{29}N_7O_6S$, protonado; peso molecular de 639,68, protonado). Antes de su uso, se disolvió tetrazina-DBCO a una concentración de 25 mg/ml en agua.

Se hizo reaccionar tetrazina-DBCO de manera individual con cada proteína de N_3-Px-Fc (figura 44) para generar la serie correspondiente de proteínas de Tet-Px-Fc (figura 45). Las reacciones (0,72 ml) contenían fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 0,1875 mg del grupo de unión tetrazina-DBCO y 0,6 mg de la proteína de N_3-Px-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones durante 3,5 horas a temperatura ambiente. Se retiró el grupo de unión sin reaccionar en exceso mediante cromatografía de proteína A HiTrap HP.

La figura 46 muestra las proteínas de Tet-Px-Fc purificadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), Tet-P0-Fc (carriles b), Tet-P12-Fc (carriles c), Tet-P24-Fc (carriles d), Tet-P36-Fc (carriles e), y Tet-P48-Fc (carriles f). El tamaño en SDS-PAGE de las proteínas de Tet-Px-Fc aumentó a medida que aumentó la longitud del grupo de unión de PEG, en condiciones tanto reductoras como no reductoras. Además, cada una de las proteínas de Tet-Px-Fc fue mayor que la proteína de N_3-Px-Fc correspondiente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (figura 50).

Ejemplo 12 (según la invención): Proteínas de transcicloocteno-Fc N-terminales

Se prepara una serie de proteínas de Fc modificadas con transcicloocteno (Tco-Px-Fc), que tienen cada una un grupo transcicloocteno en su extremo N-terminal y opcionalmente un grupo de unión de PEG_x, haciendo reaccionar un grupo de unión heterobifuncional con las proteínas de N_3-Px-Fc modificado con azida del ejemplo 4. La figura 47 muestra el grupo de unión heterobifuncional TCO-PEG_{12}-DBCO, que tiene un grupo ciclooctino en un extremo que puede

reaccionar con el grupo azida de las proteínas de N_3-Px-Fc, y un grupo transciclooctenо en el otro extremo. El grupo de unión TCO-PEG_{12}-DBCO se obtuvo de Click Chemistry Tools (artículo n.º 1005; $C_{54}H_{81}N_3O_{16}$; peso molecular de 1028,23). Antes de su uso, se disolvió TCO-PEG_{12}-DBCO a una concentración de 100 mg/ml en DMSO.

Se hace reaccionar TCO-PEG_{12}-DBCO de manera individual con cada proteína de N_3-Px-Fc (figura 47) para generar la serie correspondiente de proteínas de Tco-P12-Px-Fc (figura 48). Se muestran resultados representativos para la reacción de TCO-PEG_{12}-DBCO con la proteína N_3-P36-Fc. Las reacciones (6 ul) contenían fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 0,2 mg del grupo de unión TCO-PEG_{12}-DBCO o una serie de diluciones de dos veces del mismo en DMSO, y 5 ug de la proteína N_3-P36-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones durante 3,5 horas a temperatura ambiente.

La figura 49 muestra las proteínas de Tco-P12-Px-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: la concentración de grupo de unión Tco-P12-DBCO (mg/ml) fue de la siguiente manera: 32 (carril a), 16 (carril b), 8 (carril c), 4 (carril d), 2 (carril e), 1 (carril f), 0,5 (carril g), 0,25 (carril h), 0,125 (carril i), y 0 (carril j). La conversión de la proteína N_3-P36-Fc (I) en la proteína Tco-P12-P36-Fc (II) fue esencialmente completa a una concentración de grupo de unión Tco-P12-DBCO de 1 mg/ml (carril f). En estudios adicionales, la proteína Tco-P12-P36-Fc así obtenida se purificó mediante cromatografía de proteína A HiTrap HP, se desaló y se concentró tal como se describe en el ejemplo 4.

Para someter a prueba la reactividad de la proteína Tco-P12-P36-Fc con un grupo funcional tetrazina, en primer lugar se hizo reaccionar proteína Tco-P12-P36-Fc purificada con el grupo de unión tetrazina-DBCO heterobifuncional para preparar proteína DBCO-TT-P12-P36-Fc, que se purificó mediante proteína A y después se sometió a prueba para determinar su capacidad para reaccionar con un grupo de unión azido-PEG-amina, NH_2-PEG_{23}-N_3, obtenido de Quanta Biodesigns (artículo n.º 10525, $C_{48}H_{98}N_4O_{23}$, peso molecular de 1099,30). Las reacciones de prueba (6 ul) contenían fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 0,2 mg del grupo de unión NH_2-PEG_{23}-N_3 o una serie de diluciones de dos veces del mismo, y 5 ug de la proteína DBCO-TT-P12-P36-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones durante 1 hora a temperatura ambiente.

La figura 50 muestra los productos de reacción mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: la concentración de grupo de unión NH_2-PEG_{23}-N_3 (mg/ml) fue de la siguiente manera: 0,12 (carril a), 0,06 (carril b), 0,03 (carril c), 0,015 (carril d), 0,0075 (carril e), 0,0038 (carril f), 0,002 (carril g), 0,001 (carril h), 0 (carril i). La proteína DBCO-TT-P12-P36-Fc (III), pero no la proteína Tco-P12-P36-Fc (no mostrado), se convirtió en la proteína NH_2-P23-ND-TT-P12-P36-Fc (IV) esperada, confirmando la reactividad de la proteína Tco-P12-P36-Fc con un grupo funcional tetrazina.

Ejemplo 13 (según la invención): Inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc

Se preparó una serie de inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc (GLP1-P3-TT-Px-Fc) haciendo reaccionar un análogo de GLP-1 modificado con transciclooctenо con las proteínas de Tet-Px-Fc del ejemplo 11. También se prepararon inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc haciendo reaccionar un análogo de GLP-1 modificado con tetrazina con las proteínas de Tco-Px-Fc del ejemplo 12.

Para preparar el análogo de GLP-1 modificado con transciclooctenо, se hizo reaccionar el péptido gly8-glu22-GLP-1(7-37)-PEG_3-cys-NH_2 con un grupo de unión heterobifuncional, TCO-PEG_3-maleimida, que contenía un grupo maleimida que podía reaccionar con el grupo tiol libre en el residuo de cisteína C-terminal (figura 51). Se obtuvo TCO-PEG_3-maleimida ($C_{26}H_{41}N_3O_8$, peso molecular de 523,62) de Click Chemistry Tools (artículo n.º 1002). Antes de su uso, se disolvió el grupo de unión a una concentración de 25 mg/ml en DMSO. Las reacciones (0,42 ml) contenían MES 50 mM pH 6,5, EDTA 5 mM, 0,45 mg de péptido gly8-glu22-GLP-1(7-37)-PEG_3-cys-NH_2 y 0,375 mg del grupo de unión TCO-PEG_3-maleimida. Se llevaron a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se retiró el grupo de unión sin reaccionar en exceso mediante intercambio de tampón en fosfato de sodio 0,02 M pH 7,0 usando una columna de desalación HiTrap de 5 ml. La figura 51 muestra la estructura del análogo de GLP-1 modificado con transciclooctenо (GLP1-P6-Tco).

Se hizo reaccionar el péptido GLP1-P6-Tco de manera individual con cada una de las proteínas de Tet-Px-Fc (figura 52), para generar la serie de GLP1-P3-TT-Px-Fc de inmunoglobulinas híbridas (figura 53). Las reacciones (0,99 ml) contenían fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 0,145 mg de péptido GLP1-P6-Tco y 0,33 mg de cada proteína de Tet-Px-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se purificaron las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-P6-TT-Px-Fc mediante cromatografía sobre proteína A HiTrap HP.

Para preparar el análogo de GLP-1 modificado con tetrazina, se hace reaccionar el péptido gly8-glu22-GLP-1(7-37)-PEG_3-cys-NH_2 con un grupo de unión heterobifuncional, tetrazina-PEG_4-maleimida, que contiene un grupo maleimida que puede reaccionar con el grupo tiol libre en el residuo de cisteína C-terminal (figura 54). Se obtuvo tetrazina-PEG_4-maleimida ($C_{29}H_{39}N_7O$, peso molecular de 613,66) de Click Chemistry Tools (artículo n.º A139). Antes de su uso, se disuelve el grupo de unión a una concentración de 25 mg/ml en DMSO. Las reacciones (0,42 ml) contenían MES 50 mM pH 6,5, EDTA 5 mM, 0,45 mg de péptido gly8-glu22-GLP-1(7-37)-PEG_3-cys-NH_2 y 0,375 mg del grupo de unión tetrazina-PEG_4-Maleimida. Se llevan a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se retira el grupo de unión sin reaccionar en exceso mediante intercambio de tampón en fosfato de sodio 0,02 M pH 7,0 usando una columna de desalación HiTrap de 5 ml. La figura 54 muestra la estructura del análogo de GLP-1 modificado con tetrazina (GLP1-P7-Tet).

Se hace reaccionar el péptido GLP1-P7-Tet de manera individual con cada una de las proteínas de Tco-Px-Fc (figura 55), para generar la serie de GLP1-P7-TetTco-Px-Fc de inmunoglobulinas híbridas (figura 56). Las reacciones (0,99 ml) contienen fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 0,145 mg de péptido GLP1-P7-Tet y 0,33 mg de cada proteína de Tco-Px-Fc. Se llevan a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se purifican las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-P7-Tet/Tco-Px-Fc mediante cromatografía sobre proteína A HiTrap HP.

La figura 57 muestra las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc purificadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (izquierda) y condiciones no reductoras (derecha): control de Fc6 (carriles a), GLP1-P6-TT-P0-Fc (carriles b), GLP1-P6-TTP12-Fc (carriles c), GLP1-P6-TT-P24-Fc (carriles d), GLP1-P6-TT-P36-Fc (carriles e), y GLP1-P6-TT-P48-Fc (carriles f). El tamaño de inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc aumentó con la longitud del grupo de unión de PEG de manera comparable a las proteínas de Tet-Px-Fc.

La figura 58 compara directamente las proteínas de N_3-Px-Fc (I), las proteínas de Tet-Px-Fc (II) y las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc (III) mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: control de Fc6 (carril a), N_3-P0-Fc (carril b), Tet-P0-Fc (carril c), GLP1-P6-TT-P0-Fc (carril d), N_3-P12-Fc (carril e), Tet-P12-Fc (carril f), GLP1-P6-TT-P12-Fc (carril g), N_3-P24-Fc (carril h), Tet-P24-Fc (carril i), GLP1-P6-TT-P24-Fc (carril j), N_3-P36-Fc (carril k), Tet-P36-Fc (carril l), GLP1- P6-TT-P36-Fc (carril m), N_3-P48-Fc (carril n), Tet-P48-Fc (carril o), GLP1-P6-TT-P48-Fc (carril p). La conversión de cada proteína de Tet-Px-Fc en la inmunoglobulina híbrida de GLP1-P6-TT-Px-Fc correspondiente fue de aproximadamente el 92%.

La figura 59 muestra un transcurso de tiempo para la reacción de GLP1-P7-DBCO con N_3-P36-Fc y un transcurso de tiempo para la reacción de GLP1-P6-Tco con Tet-P36-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones tal como se describió anteriormente durante los diversos tiempos indicados, excepto porque cada reacción se terminó mediante la adición de un exceso de competidor. Para la reacción de GLP1-P7-DBCO con N_3-P36-Fc, se añadió azida de sodio hasta una concentración final del 0,1%; para la reacción de GLP1-P6-Tco con Tet-P36-Fc, se añadió TCO-PEG_3-maleimida hasta una concentración final de 3,5 mg/ml. Se analizó cada reacción mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: (panel superior) N_3-P36-Fc solo (carril a), N_3-P36-Fc + GLP1-P7-DBCO para los siguientes tiempos 0, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 horas; (panel inferior) Tet-P36-Fc solo (carril a), Tet-P36-Fc + TCO-PEG_3-maleimida solo (carril b), Tet-P36-Fc + GLP1-P6-Tco para los siguientes tiempos -4, -2, -1, 0, 1, 2, 4 minutos. La reacción de GLP1-P6-Tco con Tet-P36-Fc (I) que conduce a la formación de GLP1-P7-DN-P36-Fc (II) es mucho más rápida, llegando a completarse dentro del plazo de 1 minuto, mientras que la reacción de GLP1-P7-DBCO con N_3-P36-Fc (I) que conduce a la formación de GLP1-P7-DN-P36-Fc (II) sólo se completa al 50% después de 6 horas.

Se evaluó la actividad biológica de inmunoglobulinas híbridas de GLP1-P6-dihidropiridizina-Px-Fc en un ensayo basado en células tal como se describe en el ejemplo 6. La figura 60 muestra los resultados para el péptido GLP-1(7-37) y las proteínas de GLP1-P6-TT-Px-Fc (x = 0, 12, 24, 36, 48). Las cinco inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc indujeron niveles de cAMP comparables al péptido GLP-1(7-37). La estimulación mediante GLP-1(7-37) fue similar ya se expusieran las células a agonista durante 1, 4 o 24 horas, con una CE_{50} de ~2 nM a las 24 horas, mientras que la estimulación mediante las inmunoglobulinas híbridas de GLP1-dihidropiridizina-Fc aumentó drásticamente a medida que se expusieron las células a agonista durante tiempos más prolongados, con una CE_{50} de ~0,2 nM a las 24 horas.

Ejemplo 14 (según la invención): Inmunoglobulinas híbridas de Fab de adalimumab-dihidropiridizina-Fc

Se preparó una serie de inmunoglobulinas híbridas de Fab-dihidropiridizina-Fc (Fab-P3-TT-Px-Fc) haciendo reaccionar un fragmento Fab modificado con transciclooctenO con las proteínas de Tet-Px-Fc del ejemplo 11. También se preparan inmunoglobulinas híbridas de Fab-dihidropiridizina-Fc haciendo reaccionar un fragmento Fab modificado con tetrazina con las proteínas de Tco-Px-Fc del ejemplo 12.

Para preparar el Fab modificado con transciclooctenO, se hizo reaccionar Fab tratado con TCEP con un grupo de unión heterobifuncional, TCO-PEG_3-maleimida, que contenía un grupo maleimida que podía reaccionar con un grupo tiol libre en el Fab tratado con TCEP (figura 61). Se generó el fragmento Fab mediante digestión con papaína de 10 mg de adalimumab (Humira™) obtenido de Abbott usando un kit de preparación de Fab Pierce™ (n.º de cat. 44985) según las instrucciones del fabricante. Tras la digestión, se purificó el fragmento Fab mediante cromatografía sobre proteína A HiTrap HP para retirar el fragmento Fc y anticuerpo sin digerir. Se sometieron las fracciones de flujo a través, que contenían el fragmento Fab, a intercambio de tampón en PBS, y se concentraron hasta 5 mg/ml.

Para la reducción parcial del fragmento Fab con TCEP, las reacciones (0,26 ml) contenían fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 0,5 mg de Fab, y 0,08 mg/ml TCEP. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos, se llevó la reacción hasta 0,72 ml con la adición de 0,24 ml de fosfato de sodio 0,3 M pH 7,0 y 0,22 ml de agua. Después se añadió el grupo de unión TCO-PEG_3-maleimida a la reacción (0,12 ml a una concentración de 50 ug/ml en DMSO) y se incubó la reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se sometió el Fab modificado con transciclooctenO a intercambio de tampón en una columna PD-10 en fosfato de sodio 0,02 M pH 7,0 para retirar el grupo de unión en exceso y se concentró el producto final hasta 2,7 mg/ml. En estas condiciones, se modificó más del 90% de la cadena pesada de Fab y menos del 10% de la cadena ligera de Fab mediante el grupo de unión TCO-PEG_3-maleimida. La figura 61 muestra la estructura de la proteína de Fab modificado con transciclooctenO (Fab-P3-Tco).

Se hizo reaccionar la proteína Fab-P3-Tco de manera individual con cada una de las proteínas de Tet-Px-Fc (figura 62), para generar la serie de Fab-P3-TT-Px-Fc de inmunoglobulinas híbridas (figura 63). La reacciones (6 ul) contenían fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0, 3,6 ug de la proteína Fab-P3-Tco y 1 ug de cada proteína de Tet-Px-Fc. Se llevaron a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 60 minutos.

La figura 64 muestra las inmunoglobulinas híbridas de Fab-dihidropiridizina-Fc mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras: marcadores (carriles a), adalimumab (carril b), Fab-P3-TT-P0-Fc (carril c), Fab-P3-TT-P12-Fc (carril d), Fab-P3-TT-P24-Fc (carriles e), Fab-P3-TT-P36-Fc (carriles f), Fab-P3-TT-P48-Fc (carril g), Fab-P3-Tco (carril h), Tet-P0-Fc (carril i), Tet-P12-Fc (carril j), Tet-P24-Fc (carril k), Tet-P36-Fc (carril l)m Tet-P48-Fc (carril m). Mediante comparación con adalimumab (carril b), las inmunoglobulinas híbridas de Fab-dihidropiridizina-Fc tenían el tamaño esperado, mostrando un aumento con la longitud del grupo de unión de PEG comparable a las proteínas de Tet-Px-Fc. La conversión de cada proteína de Tet-Px-Fc en la inmunoglobulina híbrida de Fab-P3-TT-Px-Fc correspondiente fue de aproximadamente el 75%.

Ejemplo 15 (según la invención): Inmunoglobulinas híbridas de olanzapina-dihidropiridizina-Fc

En este ejemplo, se preparan inmunoglobulinas híbridas con un derivado de azida de un compuesto de amina primaria, amina secundaria o alcohol. El compuesto derivatizado con azida puede prepararse tal como se describe en Pothukanuri, S. y Winssinger, N., Org Lett. 2007; 9(11): 2223-5. En primer lugar se hace reaccionar el compuesto de amina primaria amina, amina secundaria o alcohol con cloroformiato de cloroalquilo para obtener el carbamato de cloroalquilo, seguido por un desplazamiento con azida del cloruro, proporcionando el carbamato de azidoalquilo. Todos los productos químicos se obtienen de Sigma-Aldrich.

En primer lugar se hace reaccionar olanzapina (Sigma, n.º de cat. 01141) con cloroformiato de clorometilo tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense 13/801.344, publicada el 10 de octubre de 2013, publicación n.º US20130267505 A1. Se calienta una disolución de olanzapina (60 mmol) y trietilamina (120 mmol) en diclorometano anhidro (250 ml) hasta 35ºC hasta que se forma una disolución transparente, después se enfría hasta 5ºC. Después se añade cloroformiato de clorometilo (90 mmol) a lo largo de 20 minutos. Otros cloroformiatos de cloroalquilo adecuados incluyen cloroformiato de 2-cloroetilo, cloroformiato de 3-cloropropilo y cloroformiato de 4-clorobutilo. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante 30 min y se deja calentar hasta temperatura ambiente. Después de 15 min a temperatura ambiente se diluye la mezcla de reacción con diclorometano (100 ml), después se lava con $NaHCO_3$ acuoso saturado (75 ml) y agua (350 ml). Se seca la fase orgánica sobre $MgSO_4$ y se filtra. Después se concentra la fase orgánica a vacío a 45ºC hasta un volumen de 150 ml. Se diluye la mezcla con 30 ml de acetato de etilo y se evapora adicionalmente (20-30 ml) a vacío. Se enfría la mezcla hasta temperatura ambiente y se filtra el precipitado sólido resultante y se lava con acetato de etilo. Después de secar a vacío a 35ºC durante 90 min, se obtiene 2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-5H-benzo[b]tieno[2,3-e]-[1,4]diazepin-5-carboxilato de clorometilo. Después se trata este compuesto (1,5 eq) con NaN_3 (1,5 eq) en CH_3CN:H_2O (1:1, 0,3 M) a temperatura ambiente durante de 8 a 36 horas. Se diluye la mezcla de reacción con acetato de etilo y se lava la fase orgánica con agua, salmuera, después se seca sobre Na_2SO_4 y se concentra a vacío. La purificación mediante HPLC proporciona el derivado de azida-olanzapina, 2-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)-5H-benzo[b]tieno[2,3-e]-[1,4]diazepin-5-carboxilato de azidometilo (figura 65).

Después se usa el derivado de azida-olanzapina para preparar una serie de inmunoglobulinas híbridas de olanzapina-dihidropiridizina-Fc (Ola-P12-TT-Px-Fc) de la siguiente manera. En una primera etapa, se modifica el derivado de azida-olanzapina con un grupo funcional transcicloocteno usando un grupo de unión heterobifuncional. En una segunda etapa, se hace reaccionar la olanzapina modificada con transcicloocteno con las proteínas de Tet-Px-Fc del ejemplo 11.

Para preparar la olanzapina modificada con transcicloocteno, se hace reaccionar el derivado de azida-olanzapina con el grupo de unión heterobifuncional TCO-PEG_{12}-DBCO que contiene un grupo ciclooctino que puede reaccionar con el grupo azida (figura 65). Las reacciones (1 ml) contienen 0,5 mg del derivado de azida-olanzapina y 5 mg del grupo de unión TCO-PEG_{12}-DBCO en DMSO. Se llevan a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante de 3 a 20 horas. Se purifica la olanzapina modificada con transcicloocteno (Ola-P12-Tco) mediante HPLC para retirar el grupo de unión TCO-PEG_{12}-DBCO sin reaccionar en exceso. Antes de su uso, se disuelve Ola-P12-Tco a una concentración de 1 mg/ml en DMSO.

Se hace reaccionar Ola-P12-Tco de manera individual con cada una de las proteínas de Tet-Px-Fc (figura 66), para generar la serie de Ola-P12-TT-Px-Fc de inmunoglobulinas híbridas (figura 67). Las reacciones (1 ml) contienen 0,1 mg de péptido GLP1-P7-Tet y 0,33 mg de cada proteína de Tco-Px-Fc en DMSO. Se llevan a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después se purifican las inmunoglobulinas híbridas de Ola-P12-TT-Px-Fc mediante cromatografía sobre proteína A HiTrap HP.

Discusión

Aspectos de la presente invención proporcionan la semisíntesis química de anticuerpos con bisagras no proteicas que incorporan grandes dominios de unión tales como el propio Fab o dominios extracelulares de receptor. La presente invención se refiere a la identificación de reacciones de ligación que son compatibles con la estructura y función nativas

de las proteínas relacionadas y avanzan de manera eficiente. Aspectos de la presente invención proporcionan compuestos que tienen cadenas no proteicas que son tanto flexibles como extensibles. Las moléculas de tipo anticuerpo proporcionadas en realizaciones de la invención tienen un enorme potencial como candidatos terapéuticos con afinidad de unión mejorada por sus dianas de enfermedad.

Lista de secuencias

<110> Capon, Daniel J.

<120> INMUNOGLOBULINA HÍBRIDA QUE CONTIENE UNA UNIÓN DISTINTA DE PEPTIDILO

<130> B12141WOEP.1 CA

<150> 61/953.650

<151> 14-03-2014

<160> 203

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG1 humana que tiene la secuencia N-terminal CDKTHTCPPCPAPE

<400> 1

```
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1               5                  10                  15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            20                  25                  30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        35                  40                  45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    50                  55                  60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                85                  90                  95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        115                 120                 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    130                 135                 140
```

```
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145                 150                 155                 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                165                 170                 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            180                 185                 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        195                 200                 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Pro Gly Lys
225
```

<210> 2

<211> 684

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG1 humana que tiene la secuencia N-terminal CDKTHTCPPCPAPE

<400> 2

```
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg ggggccctca       60

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc      120

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      180

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      240

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac      300

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc      360

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc      420

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg      480

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac      540

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      600

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag      660

agcctctccc tgtctccggg taaa                                             684
```

<210> 3

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 3

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
            20                  25                  30

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        35                  40                  45

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
    50                  55                  60

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
65                  70                  75                  80

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                85                  90                  95

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
            100                 105                 110

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
        115                 120                 125

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    130                 135                 140

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
145                 150                 155                 160

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                165                 170                 175

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
            180                 185                 190

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
        195                 200                 205

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
    210                 215                 220
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                245                 250
```

<210> 4

<211> 785

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 4

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60
cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag     120
cacctgaact cctgggggggg ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc     180
tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc     240
ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc     300
cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc     360
aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc     420
ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc     480
tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag     540
gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact     600
acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca     660
ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg     720
ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgactcgagc     780
ggccg                                                                785
```

<210> 5

<211> 251

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 5

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
```

```
            20                  25                  30

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        35                  40                  45

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
    50                  55                  60

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
65                  70                  75                  80

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                85                  90                  95

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
            100                 105                 110

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
        115                 120                 125

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    130                 135                 140

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
145                 150                 155                 160

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                165                 170                 175

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
            180                 185                 190

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
        195                 200                 205

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
    210                 215                 220

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
225                 230                 235                 240

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                245                 250
```

<210> 6

<211> 785

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 6

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca       60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag      120

cacctgaact cctgggggggg ccctcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc      180

tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc      240

ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc      300

cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc      360

aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc      420

ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc      480

tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag      540

gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact      600

acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca      660

ccgtggacaa gagcaggtgg cagcaggggа acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg      720

ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgactcgagc      780

ggccg                                                                  785
```

<210> 7

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 7

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            20                  25                  30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    50                  55                  60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
65                  70                  75                  80
```

```
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        115                 120                 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 8

<211> 767

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 8

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg      60

cccatgcctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg     120

ggccctcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc     180

ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact     240
```

```
ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca      300

acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca      360

aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct      420

ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg      480

agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca      540

tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg      600

tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt      660

ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca      720

cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgactcga gcggccg                    767
```

<210> 9

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG1 humana que tiene la secuencia N-terminal CPPCPAPE

<400> 9

```
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1               5                  10                  15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            20                  25                  30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
        35                  40                  45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    50                  55                  60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                85                  90                  95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            100                 105                 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        115                 120                 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
```

```
    130                 135                 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145                 150                 155                 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            180                 185                 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        195                 200                 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215                 220
```

<210> 10

<211> 666

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG1 humana que tiene la secuencia N-terminal CPPCPAPE

<400> 10

```
tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggccct cagtcttcct cttccccca       60

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac      120

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat      180

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc      240

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      300

aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa       360

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg      420

acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg      480

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc      540

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc      600

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg      660

ggtaaa                                                                 666
```

<210> 11

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 11

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            20                  25                  30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    50                  55                  60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
65                  70                  75                  80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        115                 120                 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230                 235                 240                 245
```

<210> 12

<211> 767

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 12

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60
cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg     120
ggccctcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc     180
ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact     240
ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca     300
acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca     360
aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct     420
ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg     480
agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca     540
tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg     600
tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt     660
ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca     720
cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgactcga gcggccg                   767
```

<210> 13

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 13

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            20                  25                  30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        35                  40                  45
```

```
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    50                  55                  60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
65                  70                  75                  80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        115                 120                 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 14

<211> 767

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 14

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca       60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg      120

ggccctcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc      180

ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact      240

ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca      300

acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca      360

aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct      420

ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg      480

agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca      540

tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg      600

tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt      660

ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca      720

cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgactcga gcggccg                    767
```

<210> 15

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 15

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            20                  25                  30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        35                  40                  45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    50                  55                  60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65                  70                  75                  80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
                85                  90                  95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
```

```
            100                 105                 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        115                 120                 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    130                 135                 140

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
145                 150                 155                 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                165                 170                 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
            180                 185                 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        195                 200                 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    210                 215                 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230                 235
```

<210> 16

<211> 749

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 16

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg       60

cccatgcctg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg ggggccctca gtcttcctct      120

tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg      180

tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg      240

aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg      300

tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg      360

tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc      420

cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg      480

tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga      540
gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct      600

ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct      660

tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc      720

tgtctccggg taaatgactc gagcggccg                                        749
```

<210> 17

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG1 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 17

```
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1               5                  10                  15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
            20                  25                  30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
        35                  40                  45

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
    50                  55                  60

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
65                  70                  75                  80

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
                85                  90                  95

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
            100                 105                 110

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
        115                 120                 125

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
                165                 170                 175
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
            180                 185                 190

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
        195                 200                 205

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 18

<211> 657

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG1 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 18

```
tgcccagcac ctgaactcct gggggggccc tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag       60
gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac      120
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag      180
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc      240
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc      300
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg      360
tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg      420
gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag      480
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc      540
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg      600
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa          657
```

<210> 19

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 19

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
            20                  25                  30
```

```
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
    50                  55                  60

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65                  70                  75                  80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
                85                  90                  95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            100                 105                 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
        115                 120                 125

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                165                 170                 175

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
            180                 185                 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
    210                 215                 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
225                 230                 235                 240

Gly Lys
```

<210> 20

<211> 758

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 20

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60
cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc cagcacctga actcctgggg gggccctcag     120
tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca     180
catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg     240
acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt     300
accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca     360
agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca     420
aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca     480
agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg     540
agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact     600
ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg     660
ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga     720
gcctctccct gtctccgggt aaatgactcg agcggccg                              758
```

<210> 21

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 21

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
            20                  25                  30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
    50                  55                  60

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65                  70                  75                  80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
                85                  90                  95
```

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            100                 105                 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
        115                 120                 125

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                165                 170                 175

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
            180                 185                 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
    210                 215                 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
225                 230                 235                 240

Gly Lys
```

<210> 22

<211> 758

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 22

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca       60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc cagcacctga actcctgggg gggccctcag      120

tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca      180

catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg      240

acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt      300

accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca      360
agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca      420

aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca      480

agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg      540

agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact      600

ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg      660

ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga      720

gcctctccct gtctccgggt aaatgactcg agcggccg                              758
```

<210> 23

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 23

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            20                  25                  30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        35                  40                  45

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    50                  55                  60

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
65                  70                  75                  80

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                85                  90                  95

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            100                 105                 110

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        115                 120                 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    130                 135                 140

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
145                 150                 155                 160
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                165                 170                 175

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            180                 185                 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        195                 200                 205

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    210                 215                 220

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230                 235
```

<210> 24

<211> 740

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 24

aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg 60

cccatgcctg cccagcacct gaactcctgg ggggacctc agtcttcctc ttccccccaa 120

aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg 180

tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata 240

atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc 300

tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca 360

aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac 420

cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga 480

cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc 540

agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc 600

tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 660

ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 720

gtaaatgact cgagcggccg 740

<210> 25

<211> 225

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CCVECPPCPAPE

<400> 25

```
Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
1               5                  10                  15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
            20                  25                  30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
        35                  40                  45

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
    50                  55                  60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
65                  70                  75                  80

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
                85                  90                  95

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
            100                 105                 110

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
        115                 120                 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145                 150                 155                 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
                165                 170                 175

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
            180                 185                 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
        195                 200                 205

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    210                 215                 220

Lys
225
```

<210> 26

<211> 675

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CCVECPPCPAPE

<400> 26

tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 60

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg 120

gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 180

gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 240

gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 300

gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 360

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 420

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag 480

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 540

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 600

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 660

ctgtctccgg gtaaa 675

<210> 27

<211> 248

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 27

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
            20                  25                  30

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
        35                  40                  45

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
    50                  55                  60
```

```
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
65                  70                  75                  80

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
                85                  90                  95

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
            100                 105                 110

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
    130                 135                 140

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
145                 150                 155                 160

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                165                 170                 175

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
            180                 185                 190

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
        195                 200                 205

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
    210                 215                 220

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
225                 230                 235                 240

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 28

<211> 776

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 28

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60

cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac     120
```

```
ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct      180

cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc      240

agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg      300

agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc      360

tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga      420

aaaccatctc caaaaccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat      480

cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc      540

ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca      600

cacctcccat gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca      660

agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca      720

accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgactcgag cggccg          776
```

<210> 29

<211> 248

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 29

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
            20                  25                  30

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
        35                  40                  45

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
    50                  55                  60

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
65                  70                  75                  80

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
                85                  90                  95

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
            100                 105                 110

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
        115                 120                 125
```

```
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
    130                 135                 140

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
145                 150                 155                 160

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                165                 170                 175

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
            180                 185                 190

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
        195                 200                 205

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
    210                 215                 220

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
225                 230                 235                 240

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 30

<211> 776

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 30

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca       60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac      120

ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct      180

cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc      240

agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg      300

agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc      360

tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga      420

aaaccatctc caaaaccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat      480

cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc      540

ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca      600
cacctcccat gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca      660

agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca      720

accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgactcgag cggccg          776
```

<210> 31

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 31

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
            20                  25                  30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
    50                  55                  60

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65                  70                  75                  80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
                85                  90                  95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            100                 105                 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
        115                 120                 125

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                165                 170                 175

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
            180                 185                 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
    210                 215                 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
225                 230                 235                 240

Gly Lys
```

<210> 32

<211> 758

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 32

aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg 60

cccatgcctg ttgtgtcgag tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag 120

tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca 180

cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtacgtgg 240

acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt 300

tccgtgtggt cagcgtcctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 360

agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccag ccccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca 420

aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag gagatgacca 480

agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg 540

agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact 600

ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg 660

ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga 720

gcctctccct gtctccgggt aaatgactcg agcggccg 758

<210> 33

<211> 224

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CVECPPCPAPE

<400> 33

```
Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
1               5                  10                  15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
            20                  25                  30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
        35                  40                  45

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
    50                  55                  60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
65                  70                  75                  80

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
                85                  90                  95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
            100                 105                 110

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
        115                 120                 125

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145                 150                 155                 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
                165                 170                 175

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
            180                 185                 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
        195                 200                 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215                 220
```

<210> 34

<211> 672

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CVECPPCPAPE

<400> 34

```
tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc       60

ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg       120

gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag       180

gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc       240

agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc       300

tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc       360

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc       420

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc       480

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcccg tgctggactc cgacggctcc       540

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc       600

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg       660

tctccgggta aa                                                           672
```

<210> 35

<211> 247

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 35

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
            20                  25                  30

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        35                  40                  45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    50                  55                  60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65                  70                  75                  80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                85                  90                  95
```

```
Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
            100                 105                 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        115                 120                 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
145                 150                 155                 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                165                 170                 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            180                 185                 190

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        195                 200                 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    210                 215                 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 36

<211> 773

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 36

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60

cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg     120

tggcaggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc     180

ggaccccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt     240

tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc     300

agttcaacag cacgttccgt gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga     360
acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa     420

ccatctccaa aaccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc     480

gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca     540

gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac     600

ctcccatgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga     660

gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc     720

actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg actcgagcgg ccg            773
```

<210> 37

<211> 247

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 37

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
            20                  25                  30

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        35                  40                  45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    50                  55                  60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65                  70                  75                  80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                85                  90                  95

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
            100                 105                 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        115                 120                 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
145                 150                 155                 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                165                 170                 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            180                 185                 190

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        195                 200                 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    210                 215                 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 38

<211> 773

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 38

aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca 60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg 120

tggcaggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc 180

ggaccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt 240

tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc 300

agttcaacag cacgttccgt gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga 360

acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa 420

ccatctccaa aaccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc 480

gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca 540

gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac 600

ctcccatgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga 660

gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc 720

actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg actcgagcgg ccg 773

<210> 39

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 39

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
            20                  25                  30

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
        35                  40                  45

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
    50                  55                  60

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
65                  70                  75                  80

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
                85                  90                  95

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
            100                 105                 110

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
        115                 120                 125

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
    130                 135                 140

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
145                 150                 155                 160

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
                165                 170                 175

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
            180                 185                 190

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
        195                 200                 205
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
    210                 215                 220

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225                 230                 235                 240

Lys
```

<210> 40

<211> 755

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 40

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg      60
cccatgcctg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga ccgtcagtct     120
tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacgt     180
gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg     240
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac agcacgttcc     300
gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt     360
gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag     420
ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga     480
accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt     540
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg ctggactccg     600
acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga     660
acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc     720
tctccctgtc tccgggtaaa tgactcgagc ggccg                                755
```

<210> 41

<211> 221

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CPPCPAPE

<400> 41

```
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
1               5                  10                  15
```

```
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
            20                  25                  30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
        35                  40                  45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    50                  55                  60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
65                  70                  75                  80

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
                85                  90                  95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
            100                 105                 110

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
        115                 120                 125

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
    130                 135                 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145                 150                 155                 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
                165                 170                 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
            180                 185                 190

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
        195                 200                 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215                 220
```

<210> 42

<211> 663

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CPPCPAPE

<400> 42

```
tgcccaccgt gcccagcacc acctgtggca ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa       60
```

```
cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg      120

agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat      180

gccaagacaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc      240

accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa      300

ggcctcccag ccccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca      360

caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc      420

tgcctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag      480

ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact ccgacggctc cttcttcctc      540

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc      600

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt      660

aaa                                                                    663
```

<210> 43

<211> 244

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 43

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
            20                  25                  30

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
        35                  40                  45

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
    50                  55                  60

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65                  70                  75                  80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
                85                  90                  95

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
            100                 105                 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
```

```
        115                 120                 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
    130                 135                 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
145                 150                 155                 160

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
                165                 170                 175

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
            180                 185                 190

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
        195                 200                 205

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
    210                 215                 220

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
225                 230                 235                 240

Ser Pro Gly Lys
```

<210> 44

<211> 764

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 44

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60

cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac     120

cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg     180

aggtcacgtg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactggt     240

acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca     300

gcacgttccg tgtggtcagc gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg     360

agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca     420

aaaccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga      480

tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg     540
ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc     600

tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc     660

agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc     720

agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gactcgagcg gccg                      764
```

<210> 45

<211> 244

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 45

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
            20                  25                  30

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
        35                  40                  45

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
    50                  55                  60

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
65                  70                  75                  80

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
                85                  90                  95

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
            100                 105                 110

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
        115                 120                 125

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
    130                 135                 140

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
145                 150                 155                 160

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
                165                 170                 175
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
            180                 185                 190

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
        195                 200                 205

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
    210                 215                 220

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
225                 230                 235                 240

Ser Pro Gly Lys
```

<210> 46

<211> 764

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 46

aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca 60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac 120

cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg 180

aggtcacgtg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactggt 240

acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca 300

gcacgttccg tgtggtcagc gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg 360

agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 420

aaaccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga 480

tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg 540

ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc 600

tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 660

agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc 720

agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gactcgagcg gccg 764

<210> 47

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 47

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
            20                  25                  30

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
        35                  40                  45

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
    50                  55                  60

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
65                  70                  75                  80

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
                85                  90                  95

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
            100                 105                 110

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
        115                 120                 125

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
145                 150                 155                 160

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
                165                 170                 175

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
            180                 185                 190

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
        195                 200                 205

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
    210                 215                 220

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230                 235
```

<210> 48

<211> 746

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 48

aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg 60

cccatgcctg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc 120

ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg 180

tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg 240

tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca 300

gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct 360

ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa gggcagcccc 420

gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca 480

gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 540

atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc gacggctcct 600

tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct 660

catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt 720

ctccgggtaa atgactcgag cggccg 746

<210> 49

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 49

```
Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1               5                  10                  15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            20                  25                  30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
        35                  40                  45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    50                  55                  60
```

```
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
65                  70                  75                  80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                85                  90                  95

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
            100                 105                 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
        115                 120                 125

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145                 150                 155                 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                165                 170                 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            180                 185                 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
        195                 200                 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 50

<211> 654

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG2 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 50

```
tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac       60

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa      120

gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      180

aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg      240

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca      300

gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac       360
accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc      420

aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac      480

aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag      540

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat      600

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa            654
```

<210> 51

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 51

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
            20                  25                  30

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
        35                  40                  45

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
    50                  55                  60

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
65                  70                  75                  80

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
                85                  90                  95

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
            100                 105                 110

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
        115                 120                 125

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
    130                 135                 140

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
145                 150                 155                 160

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
                165                 170                 175
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
            180                 185                 190

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
        195                 200                 205

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
    210                 215                 220

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225                 230                 235                 240

Lys
```

<210> 52

<211> 755

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 52

aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct 60

cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc cagcaccacc tgtggcagga ccgtcagtct 120

tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacgt 180

gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg 240

gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac agcacgttcc 300

gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt 360

gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag 420

ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga 480

accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt 540

gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg ctggactccg 600

acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga 660

acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc 720

tctccctgtc tccgggtaaa tgactcgagc ggccg 755

<210> 53

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 53

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
            20                  25                  30

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
        35                  40                  45

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
    50                  55                  60

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
65                  70                  75                  80

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
                85                  90                  95

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
            100                 105                 110

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
        115                 120                 125

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
    130                 135                 140

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
145                 150                 155                 160

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
                165                 170                 175

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
            180                 185                 190

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
        195                 200                 205

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
    210                 215                 220

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225                 230                 235                 240

Lys
```

<210> 54

<211> 755

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 54

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca       60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc cagcaccacc tgtggcagga ccgtcagtct      120

tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccc gaggtcacgt      180

gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg      240

gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac agcacgttcc      300

gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt      360

gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag      420

ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga      480

accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt      540

gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg ctggactccg      600

acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga      660

acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc      720

tctccctgtc tccgggtaaa tgactcgagc ggccg                                 755
```

<210> 55

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 55

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
            20                  25                  30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
```

```
        35                  40                  45

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
    50                  55                  60

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
65                  70                  75                  80

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                85                  90                  95

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            100                 105                 110

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
        115                 120                 125

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
    130                 135                 140

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                165                 170                 175

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            180                 185                 190

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        195                 200                 205

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    210                 215                 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230                 235
```

<210> 56

<211> 737

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 56

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg       60
```

cccatgcctg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac 120

ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga 180

gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 240

ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc agcgtcctca 300

ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 360

gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc cgagaaccac 420

aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 480

gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 540

cggagaacaa ctacaagacc acacctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct 600

acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 660

tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 720

aatgactcga gcggccg 737

<210> 57

<211> 267

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG3 humana que tiene la secuencia N-terminal (CPRCPEPKSDTPPP)3-CPRCPAPE

<400> 57

```
Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
1               5                   10                  15

Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro
            20                  25                  30

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
        35                  40                  45

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
    50                  55                  60

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
65                  70                  75                  80

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys
                85                  90                  95

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
            100                 105                 110
```

```
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
        115                 120                 125

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
    130                 135                 140

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
145                 150                 155                 160

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
            180                 185                 190

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
        195                 200                 205

Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
    210                 215                 220

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
225                 230                 235                 240

Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
                245                 250                 255

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            260                 265
```

<210> 58

<211> 801

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG3 humana que tiene la secuencia N-terminal (CPRCPEPKSDTPPP)3-CPRCPAPE

<400> 58

```
tgcccacggt gcccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccgtgccc acggtgccca       60

gagcccaaat cttgtgacac acctccccca tgcccacggt gcccagagcc caaatcttgt      120

gacacacctc ccccgtgccc aaggtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc      180

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggatacc cttatgattt cccggacccc tgaggtcacg      240

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaagtg gtacgtggac      300

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgttc      360
```

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 420

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa 480

ggacagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggagga gatgaccaag 540

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 600

tgggagagca gcgggcagcc ggagaacaac tacaacacca cgcctcccat gctggactcc 660

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 720

aacatcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgcttcac gcagaagagc 780

ctctccctgt ctccgggtaa a 801

<210> 59

<211> 290

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 59

Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser
20 25 30

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys
35 40 45

Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
50 55 60

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
65 70 75 80

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
85 90 95

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
100 105 110

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
115 120 125

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg
130 135 140

```
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
145                 150                 155                 160

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                165                 170                 175

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            180                 185                 190

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        195                 200                 205

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    210                 215                 220

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met
225                 230                 235                 240

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                245                 250                 255

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His
            260                 265                 270

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        275                 280                 285

Gly Lys
    290
```

<210> 60

<211> 902

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 60

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60

cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc cacggtgccc agagcccaaa tcttgtgaca     120

cacctccccc gtgcccacgg tgcccagagc ccaaatcttg tgacacacct cccccatgcc     180

cacggtgccc agagcccaaa tcttgtgaca cacctccccc gtgcccaagg tgcccagcac     240

ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gataccctta     300

tgatttcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg     360

aggtccagtt caagtggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc     420
```

gggaggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg 480

actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca 540

tcgagaaaac catctccaaa accaaaggac agccccgaga accacaggtg tacaccctgc 600

ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct 660

tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcagcgg gcagccggag aacaactaca 720

acaccacgcc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg 780

tggacaagag caggtggcag caggggaaca tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc 840

tgcacaaccg cttcacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga ctcgagcggc 900

cg 902

<210> 61

<211> 290

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 61

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser
            20                  25                  30

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys
        35                  40                  45

Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    50                  55                  60

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
65                  70                  75                  80

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                85                  90                  95

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            100                 105                 110

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        115                 120                 125

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg
```

```
    130                 135                 140

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
145                 150                 155                 160

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                165                 170                 175

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            180                 185                 190

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        195                 200                 205

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    210                 215                 220

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met
225                 230                 235                 240

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                245                 250                 255

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His
            260                 265                 270

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        275                 280                 285

Gly Lys
    290
```

<210> 62

<211> 902

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 62

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca       60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc cacggtgccc agagcccaaa tcttgtgaca      120

cacctccccc gtgcccacgg tgcccagagc ccaaatcttg tgacacacct ccccatgcc       180

cacggtgccc agagcccaaa tcttgtgaca cacctccccc gtgcccaagg tgcccagcac      240

ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gataccctta      300
```

tgatttcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg 360

aggtccagtt caagtggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc 420

gggaggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg 480

actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca 540

tcgagaaaac catctccaaa accaaaggac agccccgaga accacaggtg tacaccctgc 600

ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct 660

tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcagcgg gcagccggag aacaactaca 720

acaccacgcc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg 780

tggacaagag caggtggcag caggggaaca tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc 840

tgcacaaccg cttcacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga ctcgagcggc 900

cg 902

<210> 63

<211> 284

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 63

Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1 5 10 15

Ala Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro
20 25 30

Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
35 40 45

Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro
50 55 60

Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
65 70 75 80

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
85 90 95

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
100 105 110

Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
115 120 125

```
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
    130                 135                 140

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
145                 150                 155                 160

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
                165                 170                 175

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
            180                 185                 190

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
        195                 200                 205

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro
    210                 215                 220

Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
225                 230                 235                 240

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
                245                 250                 255

Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg
            260                 265                 270

Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        275                 280
```

<210> 64

<211> 884

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 64

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg      60

cccatgcctg cccacggtgc ccagagccca aatcttgtga cacacctccc ccgtgcccac     120

ggtgcccaga gcccaaatct tgtgacacac ctcccccatg cccacggtgc ccagagccca     180

aatcttgtga cacacctccc ccgtgcccaa ggtgcccagc acctgaactc ctgggaggac     240

cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggataccct tatgatttcc cggacccctg     300

aggtcacgtg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaagtggt     360
```

acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 420

gcacgttccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg 480

agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 540

aaaccaaagg acagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga 600

tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg 660

ccgtggagtg ggagagcagc gggcagccgg agaacaacta caacaccacg cctcccatgc 720

tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc 780

agcaggggaa catcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cgcttcacgc 840

agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gactcgagcg gccg 884

<210> 65

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG3 humana que tiene la secuencia N-terminal CPRCPAPE

<400> 65

Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

```
    130                 135                 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            180                 185                 190

Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        195                 200                 205

Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215                 220
```

<210> 66

<211> 681

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG3 humana que tiene la secuencia N-terminal CPRCPAPE

<400> 66

```
tgcccaaggt gcccagcacc tgaactcctg ggaggaccgt cagtcttcct cttccccccа       60

aaacccaagg ataccttat gatttcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac       120

gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aagtggtacg tggacggcgt ggaggtgcat       180

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc       240

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac       300

aaagccctcc cagccccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaaggaca gccccgagaa      360

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg       420

acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcagcggg       480

cagccggaga acaactacaa caccacgcct cccatgctgg actccgacgg ctccttcttc       540

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacat cttctcatgc       600

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccgc ttcacgcaga agagcctctc cctgtctccg       660

ggtaaatgac tcgagcggcc g                                                 681
```

<210> 67

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 67

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            20                  25                  30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    50                  55                  60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val
65                  70                  75                  80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        115                 120                 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230                 235                 240                 245
```

<210> 68

<211> 767

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 68

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60
cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc caaggtgccc agcacctgaa ctcctgggag     120
gaccgtcagt cttcctcttc ccccccaaaac ccaaggatac ccttatgatt tcccggaccc     180
ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaagt     240
ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca     300
acagcacgtt ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca     360
aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct     420
ccaaaaccaa aggacagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg     480
agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca     540
tcgccgtgga gtgggagagc agcgggcagc cggagaacaa ctacaacacc acgcctccca     600
tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt     660
ggcagcaggg gaacatcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccgcttca     720
cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgactcga gcggccg                   767
```

<210> 69

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 69

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            20                  25                  30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        35                  40                  45
```

```
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    50                  55                  60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val
65                  70                  75                  80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        115                 120                 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 70

<211> 767

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 70

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca      60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc caaggtgccc agcacctgaa ctcctgggag     120

gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggatac ccttatgatt tcccggaccc     180

ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaagt     240

ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca     300

acagcacgtt ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca     360

aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct     420

ccaaaaccaa aggacagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg     480

agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca     540

tcgccgtgga gtgggagagc agcgggcagc cggagaacaa ctacaacacc acgcctccca     600

tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt     660

ggcagcaggg gaacatcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccgcttca     720

cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgactcga gcggccg                   767
```

<210> 71

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 71

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            20                  25                  30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        35                  40                  45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    50                  55                  60

Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65                  70                  75                  80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
                85                  90                  95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
```

```
            100                 105                 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        115                 120                 125

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    130                 135                 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
145                 150                 155                 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
            180                 185                 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        195                 200                 205

Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    210                 215                 220

His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230                 235
```

<210> 72

<211> 749

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 72

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg       60

cccatgcctg cccaaggtgc ccagcacctg aactcctggg aggaccgtca gtcttcctct      120

tcccccaaa acccaaggat accettatga tttcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg      180

tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa gtggtacgtg gacggcgtgg      240

aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg ttccgtgtgg      300

tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg      360

tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaaggacagc      420

cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg      480

tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga      540
gcagcgggca gccggagaac aactacaaca ccacgcctcc catgctggac tccgacggct      600

ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacatct      660

tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccgctt cacgcagaag agcctctccc      720

tgtctccggg taaatgactc gagcggccg                                        749
```

<210> 73

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG3 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 73

```
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1               5                  10                  15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
            20                  25                  30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys
        35                  40                  45

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
    50                  55                  60

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
65                  70                  75                  80

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
                85                  90                  95

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
            100                 105                 110

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
        115                 120                 125

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
                165                 170                 175
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
            180                 185                 190

Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
        195                 200                 205

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215
```

<210> 74

<211> 672

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG3 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 74

```
tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag      60
gataccctta tgatttcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac     120
gaagaccccg aggtccagtt caagtggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag     180
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc     240
ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc     300
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaaggac agccccgaga accacaggtg     360
tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg     420
gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcagcgg gcagccggag     480
aacaactaca acaccacgcc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc     540
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaaca tcttctcatg ctccgtgatg     600
catgaggctc tgcacaaccg cttcacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga     660
ctcgagcggc cg                                                         672
```

<210> 75

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 75

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
            20                  25                  30
```

```
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
    50                  55                  60

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65                  70                  75                  80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg
                85                  90                  95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            100                 105                 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
        115                 120                 125

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                165                 170                 175

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met
            180                 185                 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His
    210                 215                 220

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
225                 230                 235                 240

Gly Lys
```

<210> 76

<211> 758

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de SHH

<400> 76

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60
cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc cagcacctga actcctggga ggaccgtcag     120
tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggata cccttatgat ttcccggacc cctgaggtca     180
cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaag tggtacgtgg     240
acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt     300
tccgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca     360
agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca     420
aaggacagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag gagatgacca     480
agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg     540
agtgggagag cagcgggcag ccggagaaca actacaacac cacgcctccc atgctggact     600
ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg     660
ggaacatctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccgcttc acgcagaaga     720
gcctctccct gtctccgggt aaatgactcg agcggccg                              758
```

<210> 77

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 77

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
            20                  25                  30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
    50                  55                  60

Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65                  70                  75                  80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg
```

```
                85                  90                  95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            100                 105                 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
        115                 120                 125

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                165                 170                 175

Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met
            180                 185                 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His
    210                 215                 220

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
225                 230                 235                 240

Gly Lys
```

<210> 78

<211> 758

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de IFN

<400> 78

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca       60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc cagcacctga actcctggga ggaccgtcag      120

tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggata cccttatgat ttcccggacc cctgaggtca      180

cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaag tggtacgtgg      240

acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt      300
```

tccgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 360

agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca 420

aaggacagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggag gagatgacca 480

agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg 540

agtgggagag cagcgggcag ccggagaaca actacaacac cacgcctccc atgctggact 600

ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg 660

ggaacatctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccgcttc acgcagaaga 720

gcctctccct gtctccgggt aaatgactcg agcggccg 758

<210> 79

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 79

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            20                  25                  30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        35                  40                  45

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
    50                  55                  60

Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
65                  70                  75                  80

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                85                  90                  95

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            100                 105                 110

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
        115                 120                 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    130                 135                 140
```

```
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
145                 150                 155                 160

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro
                165                 170                 175

Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            180                 185                 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        195                 200                 205

Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg
    210                 215                 220

Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225                 230                 235
```

<210> 80

<211> 740

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene péptido señal de CETP

<400> 80

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg      60

cccatgcctg cccagcacct gaactcctgg gaggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa     120

aacccaagga taccccttatg atttcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg     180

tgagccacga agaccccgag gtccagttca agtggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata     240

atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc     300

tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca     360

aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggacag ccccgagaac     420

cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga     480

cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcagcgggc     540

agccggagaa caactacaac accacgcctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc     600

tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacatc ttctcatgct     660

ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccgct tcacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg     720

gtaaatgact cgagcggccg                                                740
```

<210> 81

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG4 humana que tiene la secuencia N-terminal CPSCPAPE

<400> 81

```
Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1               5                  10                  15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            20                  25                  30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
        35                  40                  45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    50                  55                  60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                85                  90                  95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            100                 105                 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        115                 120                 125

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145                 150                 155                 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            180                 185                 190

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        195                 200                 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
    210                 215                 220
```

<210> 82

<211> 666

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG4 humana que tiene la secuencia N-terminal CPSCPAPE

<400> 82

tgcccatcat gcccagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttcct gttccccccа 60

aaacccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 120

gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 180

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 240

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 300

aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag 360

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 420

acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 480

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 540

ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc 600

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg 660

ggtaaa 666

<210> 83

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de SHH

<400> 83

Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
20 25 30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
35 40 45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
50 55 60

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

```
65                  70                  75                  80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
        115                 120                 125

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Leu Gly Lys
                245
```

<210> 84

<211> 767

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de SHH

<400> 84

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct      60

cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc catcatgccc agcacctgag ttcctggggg     120

gaccatcagt cttcctgttc ccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc     180
```

ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact 240

ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca 300

acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca 360

aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct 420

ccaaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg 480

agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca 540

tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg 600

tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt 660

ggcaggaggg gaatgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca 720

cacagaagag cctctccctg tctctgggta aatgactcga gcggccg 767

<210> 85

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de IFN

<400> 85

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
            20                  25                  30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    50                  55                  60

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
65                  70                  75                  80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
        115                 120                 125
```

```
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Leu Gly Lys
                245
```

<210> 86

<211> 767

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de IFN

<400> 86

```
aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca      60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc catcatgccc agcacctgag ttcctggggg     120

gaccatcagt cttcctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc     180

ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact     240

ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca     300

acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca     360

aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct     420

ccaaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg     480

agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca     540

tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg     600

tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt     660

ggcaggaggg gaatgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca     720

cacagaagag cctctccctg tctctgggta aatgactcga gcggccg                   767
```

<210> 87

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de CETP

<400> 87

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
            20                  25                  30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        35                  40                  45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
    50                  55                  60

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65                  70                  75                  80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
                85                  90                  95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            100                 105                 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
        115                 120                 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    130                 135                 140

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
145                 150                 155                 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                165                 170                 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
            180                 185                 190
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        195                 200                 205

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    210                 215                 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
225                 230                 235
```

<210> 88

<211> 749

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de CETP

<400> 88

```
aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg      60
cccatgcctg cccatcatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttcctgt     120
tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg     180
tggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg     240
aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg     300
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg     360
tctccaacaa aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc     420
cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg     480
tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga     540
gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct     600
ccttcttcct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct     660
tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc     720
tgtctctggg taaatgactc gagcggccg                                      749
```

<210> 89

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio Fc de IgG4 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 89

```
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1               5                  10                  15
```

```
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
            20                  25                  30

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
        35                  40                  45

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
    50                  55                  60

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
65                  70                  75                  80

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
                85                  90                  95

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
            100                 105                 110

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
        115                 120                 125

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
                165                 170                 175

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
            180                 185                 190

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
        195                 200                 205

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
    210                 215
```

<210> 90

<211> 657

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para dominio Fc de IgG4 humana que tiene la secuencia N-terminal CPAPE

<400> 90

```
tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag       60

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag      120

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag      180

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc      240

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc      300

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg      360

tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg      420

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag      480

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc      540

aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg      600

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa          657
```

<210> 91

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de SHH

<400> 91

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
            20                  25                  30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
    50                  55                  60

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65                  70                  75                  80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
                85                  90                  95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            100                 105                 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
        115                 120                 125
```

```
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                165                 170                 175

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
            180                 185                 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
    210                 215                 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Lys
```

<210> 92

<211> 758

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de SHH

<400> 92

```
aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc ctcgtctcct       60

cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag      120

tcttcctgtt ccccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc cctgaggtca      180

cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtacgtgg      240

atggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt      300

accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca      360

agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca      420

aagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgccccc atcccaggag gagatgacca      480

agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg      540

agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact      600
ccgacggctc cttcttcctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg      660

ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga      720

gcctctccct gtctctgggt aaatgactcg agcggccg                              758
```

<210> 93

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de IFN

<400> 93

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
            20                  25                  30

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        35                  40                  45

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
    50                  55                  60

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
65                  70                  75                  80

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
                85                  90                  95

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            100                 105                 110

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
        115                 120                 125

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                165                 170                 175

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
            180                 185                 190

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
    210                 215                 220

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Lys
```

<210> 94

<211> 758

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de IFN

<400> 94

aagcttgaat tcccaccatg gccttgacct ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca 60

gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgcc cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag 120

tcttcctgtt ccccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc cctgaggtca 180

cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtacgtgg 240

atggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt 300

accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 360

agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 420

aagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgccccc atcccaggag gagatgacca 480

agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta ccccagcgac atcgccgtgg 540

agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact 600

ccgacggctc cttcttcctc tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg 660

ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga 720

gcctctccct gtctctgggt aaatgactcg agcggccg 758

<210> 95

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de CETP

<400> 95

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            20                  25                  30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        35                  40                  45

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
    50                  55                  60

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
65                  70                  75                  80

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                85                  90                  95

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            100                 105                 110

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        115                 120                 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
    130                 135                 140

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
145                 150                 155                 160

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                165                 170                 175

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            180                 185                 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
        195                 200                 205

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    210                 215                 220

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
225                 230                 235
```

<210> 96

<211> 740

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica para polipéptido quimérico pre-Fc que tiene un péptido señal de CETP

<400> 96

aagcttgaat tcccaccatg ctggctgcca cagtcctgac cctggccctg ctgggcaatg 60

cccatgcctg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg ttcccccaa 120

aacccaagga cactctcatg atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg 180

tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata 240

atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc 300

tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca 360

aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagagc 420

cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga 480

cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc 540

agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc 600

tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc ttctcatgct 660

ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctctgg 720

gtaaatgact cgagcggccg 740

<210> 97

<211> 5428

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pCDNA3.1(+)

<400> 97

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120

cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180

ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300

tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360

cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420

attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480

atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540

atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctagc 900
gtttaaactt aagcttggta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc 960
agatatccag cacagtggcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca 1020
gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc 1080
ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg 1140
cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 1200
gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag 1260
gcggaaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgcatta 1320
agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg 1380
cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa 1440
gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc 1500
aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata gacggttttt 1560
cgcccttttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca 1620
acactcaacc ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc 1680
tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg 1740
tgtgtcagtt agggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 1800
tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa 1860
gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgccca 1920
tcccgccccc aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt 1980
ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag 2040
gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg agcttgtata tccattttcg 2100
gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg 2160
caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa 2220
tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg gttcttttg 2280
tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt 2340
ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa 2400

gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc 2460

ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg 2520

ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg 2580

aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg 2640

aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg 2700

gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact 2760

gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg 2820

ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc 2880

ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct 2940

ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac 3000

cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat 3060

cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc 3120

ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc 3180

actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc 3240

gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg 3300

ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg 3360

tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg ctttccagtc 3420

gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt 3480

gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct 3540

gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga 3600

taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc 3660

cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 3720

ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg 3780

aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 3840

tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt 3900

gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 3960

cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact 4020

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt 4080

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct 4140

gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 4200

cgctggtagc ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca 4260

agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta 4320

agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 4380

atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gttaccaatg 4440

cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg 4500

actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc 4560

aatgataccg cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 4620

cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 4680

ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc 4740

cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 4800

ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 4860

cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 4920

ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 4980

tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 5040

ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 5100

aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 5160

gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 5220

gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagggа ataagggcga cacggaaatg 5280

ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 5340

catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 5400

atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 5428

<210> 98

<211> 4195

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pSA

<400> 98

ctaaattgta agcgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 60

atttttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120

gatagggttg agtgttgttc cagtttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180

caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240

ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag 300

cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360

agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420

cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgtcc cattcgccat tcaggctgcg 480
caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg 600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcaagcgg ccgcaacccg ggaaaagctt ggccattgca 660
tacgttgtat ccatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc 720
atgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca 780
tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 840
gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 900
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt 960
acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 1020
cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 1080
cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg 1140
atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 1200
gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac 1260
gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa 1320
ccgtcagatc gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga 1380
ccgatccagc ctccgcggcc gggaacggtg cattggaacg cggattcccc gtgccaagag 1440
tgacgtaagt accgcctata gagtctatag gcccaccccc ttggcttctt atgcatgctc 1500
ccctgctccg acccgggctc ctcgcccgcc cggacccaca ggccaccctc aaccgtcctg 1560
gccccggacc caaaccccac ccctcactct gcttctcccc gcaggagaat tcaatcgcga 1620
aagggcccaa agatctgcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc 1680
ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt 1740
attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca 1800
ttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc 1860
tggagctagc atcccgcccc taactccgcc ctgttccgcc cattctccgc cccatggctg 1920
actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa 1980
gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcgtc gagaagcgcg cttggcgtaa 2040
tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata 2100
cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta 2160
attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa 2220
tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg 2280
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcactcaaag 2340

gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 2400

ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 2460

cgcccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca 2520

ggactataaa gataccaggc gtttcccccc ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 2580

accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 2640

catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 2700

gtgcacgaac ccccccgttc agcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta tcgtcttgag 2760

tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc 2820

agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 2880

actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 2940

gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc 3000

aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 3060

gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca 3120

aaaaggatct tcacctagat cctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 3180

atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 3240

gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 3300

atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 3360

ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt 3420

cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt 3480

agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca 3540

cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 3600

tgatccccca tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga 3660

agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 3720

gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 3780

gaatagtgta tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg 3840

ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 3900

tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 3960

tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat 4020

gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 4080

caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 4140

atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccac 4195

<210> 99

<211> 824

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo artificial

<400> 99

gttaacgaat tcccaccatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt 60

gggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg 120

ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg 180

gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggcg 240

ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg 300

gcgaagtgcc ggggcaggat ctcctgtcat ctcaccttgc tcctgccgag aaagtatcca 360

tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc 420

accaagcgaa acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc 480

aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca 540

aggcgcgcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgccga 600

atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg 660

cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg 720

aatgggctga ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgcatcg 780

ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gaagatctgt taac 824

<210> 100

<211> 6739

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pCDNA3-TNR1B-Mth

<400> 100

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120

cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180

ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300

tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360

cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420

attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480

atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540

atgcccagta catgaccttа tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660

actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720

aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780

gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840

ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctagc 900

gtttaaactt aagcttgaat tcccaccatg gcgcccgtcg ccgtctgggc cgcgctggcc 960

gtcggactgg agctctgggc tgcggcgcac gccttgcccg cccaggtggc atttacaccc 1020

tacgccccgg agcccgggag cacatgccgg ctcagagaat actatgacca gacagctcag 1080

atgtgctgca gcaaatgctc gccgggccaa catgcaaaag tcttctgtac caagacctcg 1140

gacaccgtgt gtgactcctg tgaggacagc acatacaccc agctctggaa ctgggttccc 1200

gagtgcttga gctgtggctc ccgctgtagc tctgaccagg tggaaactca agcctgcact 1260

cgggaacaga accgcatctg cacctgcagg cccggctggt actgcgcgct gagcaagcag 1320

gaggggtgcc ggctgtgcgc gccgctgcgc aagtgccgcc cgggcttcgg cgtggccaga 1380

ccaggaactg aaacatcaga cgtggtgtgc aagccctgtg ccccggggac gttctccaac 1440

acgacttcat ccacggatat ttgcaggccc caccagatct gtaacgtggt ggccatccct 1500

gggaatgcaa gcatggatgc agtctgcacg tccacgtccc ccacccggag tatggcccca 1560

ggggcagtac acttacccca gccagtgtcc acacgatccc aacacacgca gccaactcca 1620

gaacccagca ctgctccaag cacctccttc ctgctcccaa tggggcccag ccccccagct 1680

gaagggagca ctggcgacgg gtgcgtatcc ggtgacacca ttgtaatgac tagtggcggg 1740

ccccgcactg tggctgaact ggagggcaaa ccgttcaccg cactgattcg cggctctggc 1800

tacccatgcc cctcaggttt cttccgcacc tgtgaacgtg acgtatatga tctgcgtaca 1860

cgtgagggtc attgcttacg tttgacccat gatcaccgtg ttctggtgat ggatggtggc 1920

ctggaatggc gtgccgcggg tgaactggaa cgcggcgacc gcctggtgat ggatgatgca 1980

gctggcgagt ttccggcact ggcaaccttc cgtggcctgc gtggcgctgg ccgccaggat 2040

gtttatgacg ctactgttta cggtgctagc gcattcactg ctaatggctt cattgtacac 2100

gcatgtggcg agcagcccgg gaccggtctg aactcaggcc tcacgacaaa tcctggtgta 2160

tccgcttggc aggtcaacac agcttatact gcgggacaat tggtcacata taacggcaag 2220

acgtataaat gtttgcagcc ccacacctcc ttggcaggat gggaaccatc caacgttcct 2280

gccttgtggc agcttcaatg actcgagcgg cccgtttaaa cccgctgatc agcctcgact 2340

gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg 2400

gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg 2460

agtaggtgtc attctattct gggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 2520

gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga 2580

accagctggg gctctagggg gtatccccac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg 2640

ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct 2700

ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat 2760

cgggggctcc ctttagggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt 2820

gattagggtg atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg 2880

acgttggagt ccacgttctt taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac 2940

cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta 3000

aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaattaat tctgtggaat gtgtgtcagt 3060

tagggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 3120

attagtcagc aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 3180

gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccccc aactccgccc atcccgcccc 3240

taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 3300

cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 3360

gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccgg gagcttgtat atccattttc ggatctgatc 3420

aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 3480

cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 3540

ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 3600

acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 3660

cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 3720

tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 3780

aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 3840

cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc 3900

ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3960

ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 4020

gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 4080

tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 4140

ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc 4200

agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 4260

aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 4320

ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 4380

cggggatctc atgctggagt tcttcgccca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg 4440

ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcatttttt cactgcattc 4500

tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc 4560

tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 4620

cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg 4680

agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct 4740

gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4800

gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4860

ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4920

aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 4980

ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 5040

gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 5100

cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 5160

gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 5220

tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 5280

cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 5340

cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 5400

gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 5460

agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 5520

cggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 5580

tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 5640

ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 5700

taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 5760

tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt 5820

cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgctg caatgatacc 5880

gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 5940

cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attgttgccg 6000

ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac 6060

aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 6120

atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc 6180

tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact 6240

gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 6300

aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 6360

acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 6420

ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac 6480

tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 6540

aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 6600

catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg 6660

atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 6720

aaaagtgcca cctgacgtc 6739

<210> 101

<211> 457

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-TNR1B-inteína

<400> 101

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

```
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
    130                 135                 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145                 150                 155                 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
                165                 170                 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
            180                 185                 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
        195                 200                 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
    210                 215                 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225                 230                 235                 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
                245                 250                 255

Asp Gly Cys Val Ser Gly Asp Thr Ile Val Met Thr Ser Gly Gly Pro
            260                 265                 270

Arg Thr Val Ala Glu Leu Glu Gly Lys Pro Phe Thr Ala Leu Ile Arg
        275                 280                 285

Gly Ser Gly Tyr Pro Cys Pro Ser Gly Phe Phe Arg Thr Cys Glu Arg
    290                 295                 300

Asp Val Tyr Asp Leu Arg Thr Arg Glu Gly His Cys Leu Arg Leu Thr
305                 310                 315                 320

His Asp His Arg Val Leu Val Met Asp Gly Gly Leu Glu Trp Arg Ala
                325                 330                 335

Ala Gly Glu Leu Glu Arg Gly Asp Arg Leu Val Met Asp Asp Ala Ala
            340                 345                 350

Gly Glu Phe Pro Ala Leu Ala Thr Phe Arg Gly Leu Arg Gly Ala Gly
        355                 360                 365

Arg Gln Asp Val Tyr Asp Ala Thr Val Tyr Gly Ala Ser Ala Phe Thr
```

```
    370                 375                 380

Ala Asn Gly Phe Ile Val His Ala Cys Gly Glu Gln Pro Gly Thr Gly
385                 390                 395                 400

Leu Asn Ser Gly Leu Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val
                405                 410                 415

Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr
            420                 425                 430

Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser
        435                 440                 445

Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln
    450                 455
```

<210> 102

<211> 436

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de TNR1B-inteína madura

<400> 102

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125
```

```
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Cys Val Ser Gly
225                 230                 235                 240

Asp Thr Ile Val Met Thr Ser Gly Gly Pro Arg Thr Val Ala Glu Leu
                245                 250                 255

Glu Gly Lys Pro Phe Thr Ala Leu Ile Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Cys
            260                 265                 270

Pro Ser Gly Phe Phe Arg Thr Cys Glu Arg Asp Val Tyr Asp Leu Arg
        275                 280                 285

Thr Arg Glu Gly His Cys Leu Arg Leu Thr His Asp His Arg Val Leu
    290                 295                 300

Val Met Asp Gly Gly Leu Glu Trp Arg Ala Ala Gly Glu Leu Glu Arg
305                 310                 315                 320

Gly Asp Arg Leu Val Met Asp Asp Ala Ala Gly Glu Phe Pro Ala Leu
                325                 330                 335

Ala Thr Phe Arg Gly Leu Arg Gly Ala Gly Arg Gln Asp Val Tyr Asp
            340                 345                 350

Ala Thr Val Tyr Gly Ala Ser Ala Phe Thr Ala Asn Gly Phe Ile Val
        355                 360                 365

His Ala Cys Gly Glu Gln Pro Gly Thr Gly Leu Asn Ser Gly Leu Thr
```

```
    370                 375                 380

Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala
385                 390                 395                 400

Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro
                405                 410                 415

His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp
            420                 425                 430

Gln Leu Gln
        435
```

<210> 103

<211> 6103

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pCDNA3-SHH-IgG1-Fc11

<400> 103

```
gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg       60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc      180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt      240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata      300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc      360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc      420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt      480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt      540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca      600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg      660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc      720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg      780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca      840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctagc      900
gtttaaactt aagcttgaat tcccaccatg ctgctgctgg cgagatgtct gctgctagtc      960
ctcgtctcct cgctgctggt atgctcggga ctggcgtgcc caccgtgccc agcacctgaa     1020
ctcctggggg ggccctcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc     1080
```

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1140

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1200

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1260

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1320

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccccа 1380

tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1440

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1500

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1560

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1620

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgactcga gcggcccgtt 1680

taaacccgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc 1740

tcccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat 1800

gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg 1860

caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc 1920

tctatggctt ctgaggcgga aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccacgcgccc 1980

tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt 2040

gccagcgccc tagcgcccgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc 2100

ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta 2160

cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc 2220

tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg 2280

ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt 2340

ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat 2400

taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca 2460

gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct 2520

ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc 2580

ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg 2640

gctgactaat ttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc 2700

agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctc ccgggagctt 2760

gtatatccat tttcggatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac 2820

aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact 2880

gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc 2940

gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg 3000
cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg 3060
tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt 3120
catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc 3180
atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag 3240
cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg 3300
ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc 3360
tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt 3420
ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg 3480
ctacccgtga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt 3540
acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct 3600
tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccaacc tgccatcacg 3660
agatttcgat tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga 3720
cgccggctgg atgatcctcc agcgcggggа tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa 3780
cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa 3840
taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta 3900
tcatgtctgt ataccgtcga cctctagcta gagcttggcg taatcatggt catagctgtt 3960
tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 4020
gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact 4080
gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 4140
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg 4200
ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 4260
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 4320
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca 4380
tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 4440
ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg 4500
atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag 4560
gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt 4620
tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca 4680
cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 4740
cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt 4800
tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc 4860

```
cggcaaacaa accaccgctg gtagcggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag     4920
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa     4980
cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat     5040
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc     5100
tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc     5160
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc     5220
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc     5280
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc     5340
catccagtct attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt     5400
gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc     5460
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa     5520
aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt     5580
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg     5640
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgta tgcggcgacc     5700
gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa     5760
agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt     5820
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt     5880
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag     5940
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta     6000
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat     6060
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtc                       6103
```

<210> 104

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido pre-Fc6

<400> 104

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
            20                  25                  30

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
```

```
        35                  40                  45

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
    50                  55                  60

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
65                  70                  75                  80

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                85                  90                  95

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
            100                 105                 110

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
        115                 120                 125

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
    130                 135                 140

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
145                 150                 155                 160

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
                165                 170                 175

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
    210                 215                 220

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Pro Gly Lys
                245
```

<210> 105

<211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína Fc6 madura

<400> 105

```
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1               5                  10                  15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            20                  25                  30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
        35                  40                  45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    50                  55                  60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
65                  70                  75                  80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                85                  90                  95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            100                 105                 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        115                 120                 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145                 150                 155                 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                165                 170                 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
            180                 185                 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        195                 200                 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215                 220
```

<210> 106

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TNR1B modificado con alquino escindido

<220>

<221> SITIO

<222> (237)..(237)

<223> Xaa = cisteína-alquino

<400> 106

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                  10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Xaa
225                 230                 235
```

<210> 107

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de TNR1B modificado con azida

<220>

<221> SITIO

<222> (237)..(237)

<223> Xaa = cisteína-azida

<400> 107

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Xaa
225                 230                 235
```

<210> 108

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TNR1B modificado con cisteína

<400> 108

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                  10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Cys
225                 230                 235
```

<210> 109

<211> 236

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TNR1B modificado con tioéster

<220>

<221> SITIO

<222> (236)..(236)

<223> Xaa = glicina-tioéster

<400> 109

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Xaa
225                 230                 235
```

<210> 110

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína Az-DKTHT-Fc6

<220>

<221> SITIO

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = azida-ácido aspártico

<400> 110

```
Xaa Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225
```

<210> 111

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Az-PEG$_4$-DKTHT-Fc6

<220>

<221> SITIO

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = azida-PEG$_4$-ácido aspártico

<400> 111

```
Xaa Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    210                 215                 220                 225
```

<210> 112

<211> 465

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido con resto distinto de peptidilo interno. TNR1B-alquino-azida-Fc6

<220>

<221> SITIO

<222> (238)..(238)

<223> Xaa = resto distinto de peptidilo

<400> 112

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                  10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175
```

```
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Cys Xaa Asp Lys
225                 230                 235                 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
                245                 250                 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
            260                 265                 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
        275                 280                 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
    290                 295                 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305                 310                 315                 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
                325                 330                 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
            340                 345                 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
        355                 360                 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
    370                 375                 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385                 390                 395                 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
                405                 410                 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
            420                 425                 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
        435                 440                 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    450                 455                 460

Lys
465
```

<210> 113

<211> 465

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido con resto distinto de peptidilo interno. TNR1B-alquino-azida-PEG_4-Fc6

<220>

<221> SITIO

<222> (238)..(238)

<223> Xaa = resto distinto de peptidilo que contiene grupo de unión PEG_4

<400> 113

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                  10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125
```

```
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Cys Xaa Asp Lys
225                 230                 235                 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
                245                 250                 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
            260                 265                 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
        275                 280                 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
    290                 295                 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305                 310                 315                 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
                325                 330                 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
            340                 345                 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
        355                 360                 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
    370                 375                 380
```

```
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385                 390                 395                 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
                405                 410                 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
            420                 425                 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
        435                 440                 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    450                 455                 460

Lys
465
```

<210> 114

<211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Etanercept

<400> 114

```
Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
            20                  25                  30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
    50                  55                  60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65                  70                  75                  80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
                85                  90                  95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
            100                 105                 110
```

```
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
        115                 120                 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
    130                 135                 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145                 150                 155                 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
                165                 170                 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
            180                 185                 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
        195                 200                 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
    210                 215                 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
225                 230                 235                 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
                245                 250                 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        275                 280                 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    290                 295                 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                325                 330                 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            340                 345                 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365
```

```
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                405                 410                 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            420                 425                 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    450                 455                 460

Pro Gly Lys
465
```

<210> 115

<211> 4175

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pFUSE2ss-DE27-V -CLIg-hk

<400> 115

```
ggatctgcga tcgctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg       60

agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa      120

actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttcc cgagggtggg ggagaaccgt      180

atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac      240

agctgaagct tcgaggggct cgcatctctc cttcacgcgc ccgccgccct acctgaggcc      300

gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tcctgaactg      360

cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc      420

cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac      480

tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc      540

ctacctgaga tcaacatgta caggatgcaa ctcctgtctt gcattgcact aagtcttgca      600

cttgtcacga attcagacat ccagatgacc cagtctccat cctccctgtc tgcatctgta      660

ggggacagag tcaccatcac ttgtcgggca agtcagggca tcagaaatta cttagcctgg      720
```

```
tatcagcaaa aaccagggaa agcccctaag ctcctgatct atgctgcatc cactttgcaa      780
tcaggggtcc catctcggtt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc      840
agcagcctac agcctgaaga tgttgcaact tattactgtc aaaggtataa ccgtgcaccg      900
tatacttttg gccaggggac caaggtggaa atcaaacgta cggtggctgc accatctgtc      960
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg     1020
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa     1080
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc     1140
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa     1200
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag     1260
agggagctag ctcgacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat     1320
gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtgaaatt     1380
tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac     1440
aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttaaagcaag     1500
taaaacctct acaaatgtgg tatggaatta attctaaaat acagcatagc aaaactttaa     1560
cctccaaatc aagcctctac ttgaatcctt ttctgaggga tgaataaggc ataggcatca     1620
ggggctgttg ccaatgtgca ttagctgttt gcagcctcac cttctttcat ggagtttaag     1680
atatagtgta ttttcccaag gtttgaacta gctcttcatt tctttatgtt ttaaatgcac     1740
tgacctccca cattcccttt ttagtaaaat attcagaaat aatttaaata catcattgca     1800
atgaaaataa atgtttttta ttaggcagaa tccagatgct caaggccctt cataatatcc     1860
cccagtttag tagttggact tagggaacaa aggaaccttt aatagaaatt ggacagcaag     1920
aaagcgagct tctagcttta gttcctggtg tacttgaggg ggatgagttc ctcaatggtg     1980
gttttgacca gcttgccatt catctcaatg agcacaaagc agtcaggagc atagtcagag     2040
atgagctctc tgcacatgcc acaggggctg accaccctga tggatctgtc cacctcatca     2100
gagtaggggt gcctgacagc cacaatggtg tcaaagtcct tctgcccgtt gctcacagca     2160
gacccaatgg caatggcttc agcacagaca gtgaccctgc caatgtaggc ctcaatgtgg     2220
acagcagaga tgatctcccc agtcttggtc ctgatggccg ccccgacatg gtgcttgttg     2280
tcctcataga gcatggtgat cttctcagtg gcgacctcca ccagctccag atcctgctga     2340
gagatgttga aggtcttcat gatggctcct cctgtcagga gaggaaagag aagaaggtta     2400
gtacaattgc tatagtgagt tgtattatac tatgcttatg attaattgtc aaactagggc     2460
tgcagggttc atagtgccac ttttcctgca ctgccccatc tcctgcccac cctttcccag     2520
gcatagacag tcagtgactt accaaactca caggagggag aaggcagaag cttgagacag     2580
acccgcgggg ccgccgaact gcgaggggac gtggctaggg cggcttcttt tatggtgcgc     2640
```

cggccctcgg aggcagggcg ctcggggagg cctagcggcc aatctgcggt ggcaggaggc 2700

ggggccgaag gccgtgcctg accaatccgg agcacatagg agtctcagcc ccccgccccа 2760

aagcaagggg aagtcacgcg cctgtagcgc cagcgtgttg tgaaatgggg gcttgggggg 2820

gttggggccc tgactagtca aaacaaactc ccattgacgt caatggggtg gagacttgga 2880

aatccccgtg agtcaaaccg ctatccacgc ccattgatgt actgccaaaa ccgcatcatc 2940

atggtaatag cgatgactaa tacgtagatg tactgccaag taggaaagtc ccataaggtc 3000

atgtactggg cataatgcca ggcgggccat ttaccgtcat tgacgtcaat aggggggcgta 3060

cttggcatat gatacacttg atgtactgcc aagtgggcag tttaccgtaa atactccacc 3120

cattgacgtc aatggaaagt ccctattggc gttactatgg gaacatacgt cattattgac 3180

gtcaatgggc ggggggtcgtt gggcggtcag ccaggcgggc catttaccgt aagttatgta 3240

acgcctgcag gttaattaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 3300

aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 3360

atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 3420

cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 3480

ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca 3540

gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg 3600

accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat 3660

cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 3720

cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct 3780

gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 3840

aaaccaccgc tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 3900

aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 3960

actcacgtta agggattttg gtcatggcta gttaattaac atttaaatca gcggccgcaa 4020

taaaatatct ttattttcat tacatctgtg tgttggtttt ttgtgtgaat cgtaactaac 4080

atacgctctc catcaaaaca aaacgaaaca aaacaaacta gcaaaatagg ctgtccccag 4140

tgcaagtgca ggtgccagaa catttctcta tcgaa 4175

<210> 116

<211> 4776

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pPUSEss-DE27-V1-CHIg-hG1-Mth-1

<400> 116

```
ggatctgcga tcgctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg       60
agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa      120
actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttttcc cgagggtggg ggagaaccgt     180
atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac      240
agctgaagct tcgaggggct cgcatctctc cttcacgcgc ccgccgcccc acctgaggcc      300
gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tcctgaactg      360
cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc      420
cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac      480
tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc      540
ctacctgaga tcaccggcga aggagggcca ccatgtacag gatgcaactc ctgtcttgca      600
ttgcactaag tcttgcactt gtcacgaatt cggaggtgca gctggtggag tctgggggag      660
gcttggtaca gcccggcagg tccctgagac tctcctgtgc ggcctctgga ttcacctttg      720
atgattatgc catgcactgg gtccggcaag ctccagggaa gggcctggaa tgggtctcag      780
ctatcacttg gaatagtggt cacatagact atgcggactc tgtggagggc cgattcacca      840
tctccagaga caacgccaag aactccctgt atctgcaaat gaacagtctg agagctgagg      900
atacggccgt atattactgt gcgaaagtct cgtaccttag caccgcgtcc tcccttgact      960
attggggcca aggtaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc ccatcggtct     1020
tcccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg     1080
tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg     1140
gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg     1200
tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc     1260
ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat     1320
gcgtatccgg tgacaccatt gtaatgacta gtggcgggcc ccgcactgtg gctgaactgg     1380
agggcaaacc gttcaccgca ctgattcgcg gctctggcta cccatgcccc tcaggtttct     1440
tccgcacctg tgaacgtgac gtatatgatc tgcgtacacg tgagggtcat tgcttacgtt     1500
tgacccatga tcaccgtgtt ctggtgatgg atggtggcct ggaatggcgt gccgcgggtg     1560
aactggaacg cggcgaccgc ctggtgatgg atgatgcagc tggcgagttt ccggcactgg     1620
caaccttccg tggcctgcgt ggcgctggcc gccaggatgt ttatgacgct actgtttacg     1680
gtgctagcgc attcactgct aatggcttca ttgtacacgc atgtggcgag cagcccggga     1740
ccggtctgaa ctcaggcctc acgacaaatc ctggtgtatc cgcttggcag gtcaacacag     1800
cttatactgc gggacaattg gtcacatata acggcaagac gtataaatgt ttgcagcccc     1860
acacctcctt ggcaggatgg gaaccatcca acgttcctgc cttgtggcag cttcaatgag     1920
```

tcctagctgg ccagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat 1980

gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat 2040

tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca 2100

gggggaggtg tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaaatgtg gtatggaatt 2160

aatttctaaaa tacagcatag caaaacttta acctccaaat caagcctcta cttgaatcct 2220

tttctgaggg atgaataagg cataggcatc aggggctgtt gccaatgtgc attagctgtt 2280

tgcagcctca ccttctttca tggagtttaa gatatagtgt attttcccaa ggtttgaact 2340

agctcttcat ttctttatgt tttaaatgca ctgacctccc acattccctt tttagtaaaa 2400

tattcagaaa taatttaaat acatcattgc aatgaaaata aatgtttttt attaggcaga 2460

atccagatgc tcaaggccct tcataatatc ccccagttta gtagttggac ttagggaaca 2520

aaggaacctt taatagaaat tggacagcaa gaaagcgagc ttctagctta tcctcagtcc 2580

tgctcctctg ccacaaagtg cacgcagttg ccggccgggt cgcgcagggc gaactcccgc 2640

ccccacggct gctcgccgat ctcggtcatg gccggcccgg aggcgtcccg gaagttcgtg 2700

gacacgacct ccgaccactc ggcgtacagc tcgtccaggc cgcgcaccca cacccaggcc 2760

agggtgttgt ccggcaccac ctggtcctgg accgcgctga tgaacagggt cacgtcgtcc 2820

cggaccacac cggcgaagtc gtcctccacg aagtcccggg agaacccgag ccggtcggtc 2880

cagaactcga ccgctccggc gacgtcgcgc gcggtgagca ccggaacggc actggtcaac 2940

ttggccatga tggctcctcc tgtcaggaga ggaaagagaa gaaggttagt acaattgcta 3000

tagtgagttg tattatacta tgcagatata ctatgccaat gattaattgt caaactaggg 3060

ctgcagggtt catagtgcca cttttcctgc actgccccat ctcctgccca ccctttccca 3120

ggcatagaca gtcagtgact taccaaactc acaggaggga gaaggcagaa gcttgagaca 3180

gacccgcggg accgccgaac tgcgagggga cgtggctagg gcggcttctt ttatggtgcg 3240

ccggccctcg gaggcagggc gctcggggag gcctagcggc caatctgcgg tggcaggagg 3300

cggggccgaa ggccgtgcct gaccaatccg gagcacatag gagtctcagc cccccgcccc 3360

aaagcaaggg gaagtcacgc gcctgtagcg ccagcgtgtt gtgaaatggg ggcttggggg 3420

ggttggggcc ctgactagtc aaaacaaact cccattgacg tcaatggggt ggagacttgg 3480

aaatccccgt gagtcaaacc gctatccacg cccattgatg tactgccaaa accgcatcat 3540

catggtaata gcgatgacta atacgtagat gtactgccaa gtaggaaagt cccataaggt 3600

catgtactgg gcataatgcc aggcgggcca tttaccgtca ttgacgtcaa taggggcgt 3660

acttggcata tgatacactt gatgtactgc caagtgggca gtttaccgta aatactccac 3720

ccattgacgt caatggaaag tccctattgg cgttactatg ggaacatacg tcattattga 3780

cgtcaatggg cgggggtcgt tgggcggtca gccaggcggg ccatttaccg taagttatgt 3840

aacgcctgca ggttaattaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 3900

aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 3960

aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 4020

cccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg 4080

tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 4140

agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 4200

gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta 4260

tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 4320

acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc 4380

tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 4440

caaaccaccg ctggtagcgg tggtttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 4500

aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 4560

aactcacgtt aagggatttt ggtcatggct agttaattaa catttaaatc agcggccgca 4620

ataaaatatc tttattttca ttacatctgt gtgttggttt tttgtgtgaa tcgtaactaa 4680

catacgctct ccatcaaaac aaaacgaaac aaaacaaact agcaaaatag gctgtcccca 4740

gtgcaagtgc aggtgccaga acatttctct atcgaa 4776

<210> 117

<211> 4779

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pFUSEss-DE27-V1-CHIg-hG1-Mth-2

<400> 117

ggatctgcga tcgctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg 60

agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa 120

actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttttcc cgagggtggg ggagaaccgt 180

atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac 240

agctgaagct tcgaggggct cgcatctctc cttcacgcgc ccgccgccct acctgaggcc 300

gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tcctgaactg 360

cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc 420

cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac 480

tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc 540

ctacctgaga tcaccggcga aggagggcca ccatgtacag gatgcaactc ctgtcttgca 600

```
ttgcactaag tcttgcactt gtcacgaatt cggaggtgca gctggtggag tctgggggag      660
gcttggtaca gcccggcagg tccctgagac tctcctgtgc ggcctctgga ttcacctttg      720
atgattatgc catgcactgg gtccggcaag ctccagggaa gggcctggaa tgggtctcag      780
ctatcacttg gaatagtggt cacatagact atgcggactc tgtggagggc cgattcacca      840
tctccagaga caacgccaag aactccctgt atctgcaaat gaacagtctg agagctgagg      900
atacggccgt atattactgt gcgaaagtct cgtaccttag caccgcgtcc tcccttgact      960
attggggcca aggtaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc ccatcggtct     1020
tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg     1080
tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg     1140
gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg     1200
tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc     1260
ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacag     1320
ggtgcgtatc cggtgacacc attgtaatga ctagtggcgg gccccgcact gtggctgaac     1380
tggagggcaa accgttcacc gcactgattc gcggctctgg ctacccatgc ccctcaggtt     1440
tcttccgcac ctgtgaacgt gacgtatatg atctgcgtac acgtgagggt cattgcttac     1500
gtttgaccca tgatcaccgt gttctggtga tggatggtgg cctggaatgg cgtgccgcgg     1560
gtgaactgga acgcggcgac cgcctggtga tggatgatgc agctggcgag tttccggcac     1620
tggcaacctt ccgtggcctg cgtggcgctg gccgccagga tgtttatgac gctactgttt     1680
acggtgctag cgcattcact gctaatggct tcattgtaca cgcatgtggc gagcagcccg     1740
ggaccggtct gaactcaggc ctcacgacaa atcctggtgt atccgcttgg caggtcaaca     1800
cagcttatac tgcgggacaa ttggtcacat ataacggcaa gacgtataaa tgtttgcagc     1860
cccacacctc cttggcagga tgggaaccat ccaacgttcc tgccttgtgg cagcttcaat     1920
gagtcctagc tggccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag     1980
aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac     2040
cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt     2100
tcaggggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtatgga     2160
attaattcta aaatacagca tagcaaaact ttaacctcca aatcaagcct ctacttgaat     2220
ccttttctga gggatgaata aggcataggc atcaggggct gttgccaatg tgcattagct     2280
gtttgcagcc tcaccttctt tcatggagtt taagatatag tgtattttcc caaggtttga     2340
actagctctt catttcttta tgttttaaat gcactgacct cccacattcc ctttttagta     2400
aaatattcag aaataattta aatacatcat tgcaatgaaa ataaatgttt tttattaggc     2460
```

agaatccaga tgctcaaggc ccttcataat atcccccagt ttagtagttg gacttaggga 2520

acaaaggaac ctttaataga aattggacag caagaaagcg agcttctagc ttatcctcag 2580

tcctgctcct ctgccacaaa gtgcacgcag ttgccggccg ggtcgcgcag ggcgaactcc 2640

cgccccccacg gctgctcgcc gatctcggtc atggccggcc cggaggcgtc ccggaagttc 2700

gtggacacga cctccgacca ctcggcgtac agctcgtcca ggccgcgcac ccacacccag 2760

gccagggtgt tgtccggcac cacctggtcc tggaccgcgc tgatgaacag ggtcacgtcg 2820

tcccggacca caccggcgaa gtcgtcctcc acgaagtccc gggagaaccc gagccggtcg 2880

gtccagaact cgaccgctcc ggcgacgtcg cgcgcggtga gcaccggaac ggcactggtc 2940

aacttggcca tgatggctcc tcctgtcagg agaggaaaga gaagaaggtt agtacaattg 3000

ctatagtgag ttgtattata ctatgcagat atactatgcc aatgattaat tgtcaaacta 3060

gggctgcagg gttcatagtg ccacttttcc tgcactgccc catctcctgc ccaccctttc 3120

ccaggcatag acagtcagtg acttaccaaa ctcacaggag ggagaaggca gaagcttgag 3180

acagacccgc gggaccgccg aactgcgagg ggacgtggct agggcggctt cttttatggt 3240

gcgccggccc tcggaggcag ggcgctcggg gaggcctagc ggccaatctg cggtggcagg 3300

aggcggggcc gaaggccgtg cctgaccaat ccggagcaca taggagtctc agccccccgc 3360

cccaaagcaa ggggaagtca cgcgcctgta gcgccagcgt gttgtgaaat gggggcttgg 3420

gggggttggg gccctgacta gtcaaaacaa actcccattg acgtcaatgg ggtggagact 3480

tggaaatccc cgtgagtcaa accgctatcc acgcccattg atgtactgcc aaaaccgcat 3540

catcatggta atagcgatga ctaatacgta gatgtactgc caagtaggaa agtcccataa 3600

ggtcatgtac tgggcataat gccaggcggg ccatttaccg tcattgacgt caataggggg 3660

cgtacttggc atatgataca cttgatgtac tgccaagtgg gcagtttacc gtaaatactc 3720

cacccattga cgtcaatgga aagtccctat tggcgttact atgggaacat acgtcattat 3780

tgacgtcaat gggcgggggt cgttgggcgg tcagccaggc gggccattta ccgtaagtta 3840

tgtaacgcct gcaggttaat taagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 3900

cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccccctga cgagcatcac 3960

aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 4020

tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 4080

ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 4140

ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 4200

cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 4260

ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 4320

gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggt 4380

atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 4440

aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 4500

aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 4560

gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg gctagttaat taacatttaa atcagcggcc 4620

gcaataaaat atctttattt tcattacatc tgtgtgttgg ttttttgtgt gaatcgtaac 4680

taacatacgc tctccatcaa aacaaaacga aacaaaacaa actagcaaaa taggctgtcc 4740

ccagtgcaag tgcaggtgcc agaacatttc tctatcgaa 4779

<210> 118

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera pre-kappa de adalimumab

<400> 118

```
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1               5                  10                  15

Val Thr Asn Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
        35                  40                  45

Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn
            100                 105                 110

Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 119

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera kappa madura de adalimumab

<400> 119

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 120

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de pre-cadena pesada-inteína

<400> 120

```
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1               5                  10                  15

Val Thr Asn Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
            20                  25                  30

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
        35                  40                  45

Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
                85                  90                  95

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110
```

```
Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu
        115                 120                 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225                 230                 235                 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Val Ser Gly Asp Thr Ile
                245                 250                 255

Val Met Thr Ser Gly Gly Pro Arg Thr Val Ala Glu Leu Glu Gly Lys
            260                 265                 270

Pro Phe Thr Ala Leu Ile Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Cys Pro Ser Gly
        275                 280                 285

Phe Phe Arg Thr Cys Glu Arg Asp Val Tyr Asp Leu Arg Thr Arg Glu
    290                 295                 300

Gly His Cys Leu Arg Leu Thr His Asp His Arg Val Leu Val Met Asp
305                 310                 315                 320

Gly Gly Leu Glu Trp Arg Ala Ala Gly Glu Leu Glu Arg Gly Asp Arg
                325                 330                 335

Leu Val Met Asp Asp Ala Ala Gly Glu Phe Pro Ala Leu Ala Thr Phe
            340                 345                 350

Arg Gly Leu Arg Gly Ala Gly Arg Gln Asp Val Tyr Asp Ala Thr Val
        355                 360                 365
```

```
Tyr Gly Ala Ser Ala Phe Thr Ala Asn Gly Phe Ile Val His Ala Cys
    370                 375                 380

Gly Glu Gln Pro Gly Thr Gly Leu Asn Ser Gly Leu Thr Thr Asn Pro
385                 390                 395                 400

Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu
                405                 410                 415

Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser
            420                 425                 430

Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln
        435                 440                 445
```

<210> 121

<211> 428

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de cadena pesada-intein madura

<400> 121

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125
```

```
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Val Ser Gly Asp Thr Ile Val Met Thr Ser
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Arg Thr Val Ala Glu Leu Glu Gly Lys Pro Phe Thr Ala
                245                 250                 255

Leu Ile Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Cys Pro Ser Gly Phe Phe Arg Thr
            260                 265                 270

Cys Glu Arg Asp Val Tyr Asp Leu Arg Thr Arg Glu Gly His Cys Leu
        275                 280                 285

Arg Leu Thr His Asp His Arg Val Leu Val Met Asp Gly Gly Leu Glu
    290                 295                 300

Trp Arg Ala Ala Gly Glu Leu Glu Arg Gly Asp Arg Leu Val Met Asp
305                 310                 315                 320

Asp Ala Ala Gly Glu Phe Pro Ala Leu Ala Thr Phe Arg Gly Leu Arg
                325                 330                 335

Gly Ala Gly Arg Gln Asp Val Tyr Asp Ala Thr Val Tyr Gly Ala Ser
            340                 345                 350

Ala Phe Thr Ala Asn Gly Phe Ile Val His Ala Cys Gly Glu Gln Pro
        355                 360                 365

Gly Thr Gly Leu Asn Ser Gly Leu Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala
    370                 375                 380
Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn
385                 390                 395                 400

Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp
                405                 410                 415

Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln
            420                 425
```

<210> 122

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico de pre-cadena pesada-inteína

<400> 122

```
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1               5                  10                  15

Val Thr Asn Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
            20                  25                  30

Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
        35                  40                  45

Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
                85                  90                  95

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu
        115                 120                 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225                 230                 235                 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Cys Val Ser Gly Asp Thr
                245                 250                 255

Ile Val Met Thr Ser Gly Gly Pro Arg Thr Val Ala Glu Leu Glu Gly
            260                 265                 270

Lys Pro Phe Thr Ala Leu Ile Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Cys Pro Ser
        275                 280                 285

Gly Phe Phe Arg Thr Cys Glu Arg Asp Val Tyr Asp Leu Arg Thr Arg
    290                 295                 300

Glu Gly His Cys Leu Arg Leu Thr His Asp His Arg Val Leu Val Met
305                 310                 315                 320

Asp Gly Gly Leu Glu Trp Arg Ala Ala Gly Glu Leu Glu Arg Gly Asp
                325                 330                 335

Arg Leu Val Met Asp Asp Ala Ala Gly Glu Phe Pro Ala Leu Ala Thr
            340                 345                 350

Phe Arg Gly Leu Arg Gly Ala Gly Arg Gln Asp Val Tyr Asp Ala Thr
        355                 360                 365

Val Tyr Gly Ala Ser Ala Phe Thr Ala Asn Gly Phe Ile Val His Ala
    370                 375                 380

Cys Gly Glu Gln Pro Gly Thr Gly Leu Asn Ser Gly Leu Thr Thr Asn
385                 390                 395                 400

Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln
                405                 410                 415
Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr
            420                 425                 430

Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu
        435                 440                 445

Gln
```

<210> 123

<211> 429

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de cadena pesada-inteína madura

<400> 123

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Gly Cys Val Ser Gly Asp Thr Ile Val Met Thr
225                 230                 235                 240

Ser Gly Gly Pro Arg Thr Val Ala Glu Leu Glu Gly Lys Pro Phe Thr
                245                 250                 255

Ala Leu Ile Arg Gly Ser Gly Tyr Pro Cys Pro Ser Gly Phe Phe Arg
            260                 265                 270

Thr Cys Glu Arg Asp Val Tyr Asp Leu Arg Thr Arg Glu Gly His Cys
        275                 280                 285

Leu Arg Leu Thr His Asp His Arg Val Leu Val Met Asp Gly Gly Leu
    290                 295                 300

Glu Trp Arg Ala Ala Gly Glu Leu Glu Arg Gly Asp Arg Leu Val Met
305                 310                 315                 320

Asp Asp Ala Ala Gly Glu Phe Pro Ala Leu Ala Thr Phe Arg Gly Leu
                325                 330                 335

Arg Gly Ala Gly Arg Gln Asp Val Tyr Asp Ala Thr Val Tyr Gly Ala
            340                 345                 350

Ser Ala Phe Thr Ala Asn Gly Phe Ile Val His Ala Cys Gly Glu Gln
        355                 360                 365

Pro Gly Thr Gly Leu Asn Ser Gly Leu Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser
    370                 375                 380

Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr
385                 390                 395                 400

Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly
                405                 410                 415
Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln
            420                 425
```

<210> 124

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Parte de proteína de Fab-1 modificado con alquino de adalimumab. Modificada en el extremo C-terminal.

<220>

<221> SITIO

<222> (230)..(230)

<223> Xaa = cisteína-alquino

<400> 124

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Xaa
225                 230
```

<210> 125

<211> 231

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Parte de proteína de Fab-2 modificado con alquino de adalimumab. Modificada en el extremo C-terminal.

<220>

<221> SITIO

<222> (131)..(131)

<223> Xaa = cisteína-alquino

<220>

<221> misc_feature

<222> (231)..(231)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

<400> 125

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Gly Xaa
225                 230
```

<210> 126

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Parte de proteína de Fab-1 modificado con azida de adalimumab. Extremo C-terminal modificado

<220>

<221> SITIO

<222> (230)..(230)

<223> Xaa = cisteína-azida

<400> 126

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Xaa
225                 230
```

<210> 127

<211> 231

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Parte de proteína de Fab-2 modificado con azida de azalidumab. Extremo C-terminal modificado

<220>

<221> SITIO

<222> (231)..(231)

<223> Xaa = cisteína-azida

<400> 127

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Xaa
    210                 215                 220                 225                 230
```

<210> 128

<211> 214

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 128

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
            20                  25                  30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        195                 200                 205                 210
```

<210> 129

<211> 450

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 129

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
```

```
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly Lys
    450
```

<210> 130

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal C

<400> 130

```
Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1               5                  10                  15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr
            20                  25                  30

Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
                85                  90                  95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
            100                 105                 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
        115                 120                 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
    130                 135                 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
            180                 185                 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        195                 200                 205                 210                 215
```

<210> 131

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 131

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
            20                  25                  30

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
        35                  40                  45

Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 132

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 132

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
            20                  25                  30

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
        35                  40                  45

Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 133

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 133

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
            20                  25                  30

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
        35                  40                  45

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
    50                  55                  60

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
65                  70                  75                  80

Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
                85                  90                  95

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr
            100                 105                 110

Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
        115                 120                 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
    130                 135                 140
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145                 150                 155                 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
                165                 170                 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
            180                 185                 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
        195                 200                 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
    210                 215                 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 134

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CP

<400> 134

```
Cys Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
            20                  25                  30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
        35                  40                  45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65                  70                  75                  80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr
                85                  90                  95

Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
            100                 105                 110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
        115                 120                 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    130                 135                 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            180                 185                 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 135

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 135

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
            20                  25                  30

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
        35                  40                  45

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
    50                  55                  60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
                85                  90                  95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
        115                 120                 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
    130                 135                 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145                 150                 155                 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
                165                 170                 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
            180                 185                 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
        195                 200                 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
    210                 215                 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 136

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 136

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
            20                  25                  30

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
        35                  40                  45

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
    50                  55                  60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
                85                  90                  95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
            100                 105                 110

Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
        115                 120                 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
    130                 135                 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145                 150                 155                 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
                165                 170                 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
            180                 185                 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
        195                 200                 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
    210                 215                 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 137

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 137

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
            20                  25                  30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
        35                  40                  45
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
65                  70                  75                  80

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
                85                  90                  95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
            100                 105                 110

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
        115                 120                 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
    130                 135                 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145                 150                 155                 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
                165                 170                 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
            180                 185                 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
        195                 200                 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
    210                 215                 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 138

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CPP

<400> 138

```
Cys Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
1               5                  10                  15
```

```
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
            20                  25                  30

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
        35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
    50                  55                  60

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65                  70                  75                  80

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
                85                  90                  95

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
        115                 120                 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
            180                 185                 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
        195                 200                 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 139

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 139

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
```

```
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 140

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 140

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 141

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 141

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
        35                  40                  45

Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
            100                 105                 110

Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 142

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CPR

<400> 142

```
Cys Pro Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
            20                  25                  30

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
        35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
    50                  55                  60

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65                  70                  75                  80

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
                85                  90                  95

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
        115                 120                 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
            180                 185                 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
        195                 200                 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 143

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 143

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 144

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 144

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 145

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 145

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Arg Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
        35                  40                  45

Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
            100                 105                 110
Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 146

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CPS

<400> 146

```
Cys Pro Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
            20                  25                  30

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
        35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
    50                  55                  60

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65                  70                  75                  80
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
                85                  90                  95

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
        115                 120                 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
            180                 185                 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
        195                 200                 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 147

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 147

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 148

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 148

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 149

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 149

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15
```

```
Ala Cys Pro Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
        35                  40                  45

Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
            100                 105                 110

Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 150

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CDKT

<400> 150

```
Cys Asp Lys Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
1               5                  10                  15

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
            20                  25                  30

Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
    50                  55                  60

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65                  70                  75                  80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
                85                  90                  95

Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 151

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 151

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Lys Thr Asp Ile Gln Met Thr
            20                  25                  30

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
        35                  40                  45

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln
    50                  55                  60

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr
                85                  90                  95

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
    130                 135                 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145                 150                 155                 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
                165                 170                 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
            180                 185                 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
    210                 215                 220
His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240
```

Cys

<210> 152

<211> 241

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 152

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Lys Thr Asp Ile Gln Met Thr
            20                  25                  30

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
        35                  40                  45

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln
    50                  55                  60

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr
                85                  90                  95

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
    130                 135                 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145                 150                 155                 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
                165                 170                 175
Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
            180                 185                 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
    210                 215                 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 153

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 153

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Asp Lys Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
            20                  25                  30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
        35                  40                  45

Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
    50                  55                  60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro
65                  70                  75                  80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His
            100                 105                 110

Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        115                 120                 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
    130                 135                 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
            180                 185                 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        195                 200                 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
    210                 215                 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 154

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CDKTHT

<400> 154

```
Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
1               5                  10                  15

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
            20                  25                  30

Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
        35                  40                  45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85                  90                  95

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
            100                 105                 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
        115                 120                 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
    130                 135                 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145                 150                 155                 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
            180                 185                 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215                 220
```

<210> 155

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 155

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Ile Gln
            20                  25                  30

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
        35                  40                  45

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp
    50                  55                  60

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
65                  70                  75                  80

Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser
                85                  90                  95
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
            100                 105                 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
    130                 135                 140

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
145                 150                 155                 160

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
                165                 170                 175

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
            180                 185                 190

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
        195                 200                 205

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
    210                 215                 220

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
225                 230                 235                 240

Gly Glu Cys
```

<210> 156

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 156

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Ile Gln
            20                  25                  30

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
        35                  40                  45
Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp
    50                  55                  60

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
65                  70                  75                  80

Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser
                85                  90                  95

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
            100                 105                 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
    130                 135                 140

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
145                 150                 155                 160

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
                165                 170                 175

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
            180                 185                 190

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
        195                 200                 205

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
    210                 215                 220

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
225                 230                 235                 240

Gly Glu Cys
```

<210> 157

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 157

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
```

```
1               5                   10                  15

Ala Cys Asp Lys Thr His Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
            20                  25                  30

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly
65                  70                  75                  80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
            100                 105                 110

Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
        115                 120                 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
    130                 135                 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145                 150                 155                 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
            180                 185                 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
        195                 200                 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
    210                 215                 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 158

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CVE

<400> 158

```
Cys Val Glu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
            20                  25                  30

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
        35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
    50                  55                  60

Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65                  70                  75                  80

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
                85                  90                  95

Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
        115                 120                 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
    130                 135                 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
            180                 185                 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
        195                 200                 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 159

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 159

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Val Glu Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 160

<211> 240

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 160

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Val Glu Asp Ile Gln Met Thr Gln
            20                  25                  30

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
        35                  40                  45

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
    50                  55                  60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
                85                  90                  95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
        115                 120                 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
                165                 170                 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
            180                 185                 190
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
        195                 200                 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
    210                 215                 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235                 240
```

<210> 161

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 161

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Val Glu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
        35                  40                  45

Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
            100                 105                 110

Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 162

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CDTPPP

<400> 162

```
Cys Asp Thr Pro Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
1               5                  10                  15

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
            20                  25                  30

Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
        35                  40                  45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85                  90                  95

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
            100                 105                 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
        115                 120                 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
    130                 135                 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145                 150                 155                 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
            180                 185                 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
        195                 200                 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215                 220
```

<210> 163

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de SHH

<400> 163

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Thr Pro Pro Pro Asp Ile Gln
            20                  25                  30

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
        35                  40                  45

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp
    50                  55                  60

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
65                  70                  75                  80

Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser
                85                  90                  95

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
            100                 105                 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly
        115                 120                 125
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
    130                 135                 140

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
145                 150                 155                 160

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
                165                 170                 175

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
            180                 185                 190

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
        195                 200                 205

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
    210                 215                 220

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
225                 230                 235                 240

Gly Glu Cys
```

<210> 164

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de IFN

<400> 164

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Thr Pro Pro Pro Asp Ile Gln
            20                  25                  30

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
        35                  40                  45

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp
    50                  55                  60

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala
65                  70                  75                  80
Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser
                85                  90                  95

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
            100                 105                 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
    130                 135                 140

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
145                 150                 155                 160

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
                165                 170                 175

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
            180                 185                 190

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
        195                 200                 205

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
    210                 215                 220

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
225                 230                 235                 240

Gly Glu Cys
```

<210> 165

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-ligero que tiene péptido señal de CETP

<400> 165

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Asp Thr Pro Pro Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
            20                  25                  30
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly
65                  70                  75                  80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
            100                 105                 110

Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
        115                 120                 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
    130                 135                 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145                 150                 155                 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
            180                 185                 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
        195                 200                 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
    210                 215                 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 166

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal C

<400> 166

```
Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
```

```
1               5                   10                  15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
            20                  25                  30

Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser
    50                  55                  60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255
```

```
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 167

<211> 474

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 167

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
```

```
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
            20                  25                  30

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
        35                  40                  45

Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala
    50                  55                  60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala
                85                  90                  95

Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
            100                 105                 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe
        115                 120                 125

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                165                 170                 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
            180                 185                 190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
        195                 200                 205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
    210                 215                 220

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
225                 230                 235                 240

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
                245                 250                 255
```

```
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
            260                 265                 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
        275                 280                 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
    290                 295                 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305                 310                 315                 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                325                 330                 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
            340                 345                 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
        355                 360                 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
    370                 375                 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385                 390                 395                 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                405                 410                 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
            420                 425                 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
        435                 440                 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    450                 455                 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 168

<211> 474

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 168

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
            20                  25                  30

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
        35                  40                  45

Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala
    50                  55                  60

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala
                85                  90                  95

Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
            100                 105                 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe
        115                 120                 125

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                165                 170                 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
            180                 185                 190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
        195                 200                 205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
    210                 215                 220

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
225                 230                 235                 240
```

```
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
                245                 250                 255

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
            260                 265                 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
        275                 280                 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
    290                 295                 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305                 310                 315                 320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                325                 330                 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
            340                 345                 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
        355                 360                 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
    370                 375                 380

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385                 390                 395                 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                405                 410                 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
            420                 425                 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
        435                 440                 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    450                 455                 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 169

<211> 468

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 169

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
            20                  25                  30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
        35                  40                  45

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
    50                  55                  60

Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp
65                  70                  75                  80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr
                85                  90                  95

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
        115                 120                 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
    130                 135                 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145                 150                 155                 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
            180                 185                 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
        195                 200                 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
    210                 215                 220
```

```
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225                 230                 235                 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
                245                 250                 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            260                 265                 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        275                 280                 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    290                 295                 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305                 310                 315                 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                325                 330                 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            340                 345                 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        355                 360                 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    370                 375                 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385                 390                 395                 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                405                 410                 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            420                 425                 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        435                 440                 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Pro Gly Lys
465
```

<210> 170

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CP

<400> 170

```
Cys Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
1               5                  10                  15

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
            20                  25                  30

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp
    50                  55                  60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
        115                 120                 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
    130                 135                 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
            180                 185                 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
        195                 200                 205
```

```
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
    210                 215                 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        275                 280                 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
    290                 295                 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                 310                 315                 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
                325                 330                 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            340                 345                 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
        355                 360                 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 171

<211> 475

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 171

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
            20                  25                  30

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
        35                  40                  45

Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln
    50                  55                  60

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn
65                  70                  75                  80

Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
            100                 105                 110

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly
        115                 120                 125

Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    130                 135                 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145                 150                 155                 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
                165                 170                 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
            180                 185                 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
        195                 200                 205
```

```
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
    210                 215                 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225                 230                 235                 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
                245                 250                 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
            260                 265                 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
        275                 280                 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
    290                 295                 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
305                 310                 315                 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                325                 330                 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            340                 345                 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
        355                 360                 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
    370                 375                 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                405                 410                 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            420                 425                 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        435                 440                 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    450                 455                 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 172

<211> 475

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 172

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
            20                  25                  30

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
        35                  40                  45

Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln
    50                  55                  60

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn
65                  70                  75                  80

Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
            100                 105                 110

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly
        115                 120                 125

Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    130                 135                 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145                 150                 155                 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
                165                 170                 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
            180                 185                 190
```

```
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
        195                 200                 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
    210                 215                 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225                 230                 235                 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
                245                 250                 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
            260                 265                 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
        275                 280                 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
    290                 295                 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
305                 310                 315                 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                325                 330                 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            340                 345                 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
        355                 360                 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
    370                 375                 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                405                 410                 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            420                 425                 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        435                 440                 445
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    450                 455                 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 173

<211> 469

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 173

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
        35                  40                  45

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
        115                 120                 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
    130                 135                 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
                165                 170                 175
```

```
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
            180                 185                 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
        195                 200                 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
    210                 215                 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
225                 230                 235                 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
                245                 250                 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            260                 265                 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        275                 280                 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    290                 295                 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305                 310                 315                 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                325                 330                 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
            340                 345                 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        355                 360                 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
    370                 375                 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385                 390                 395                 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                405                 410                 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
            420                 425                 430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        435                 440                 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    450                 455                 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465
```

<210> 174

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CPP

<400> 174

```
Cys Pro Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1               5                  10                  15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
    50                  55                  60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160
```

```
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
        355                 360                 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385                 390                 395                 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                 410                 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            420                 425                 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 175

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 175

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Pro Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 176

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 176

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Pro Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140
```

```
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400
```

```
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 177

<211> 470

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 177

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                   10                  15

Ala Cys Pro Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
            20                  25                  30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
        35                  40                  45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
        115                 120                 125
```

```
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380
```

```
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 178

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CPR

<400> 178

```
Cys Pro Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1               5                   10                  15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
    50                  55                  60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
            100                 105                 110
```

```
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
        355                 360                 365
```

```
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385                 390                 395                 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                 410                 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            420                 425                 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 179

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 179

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Arg Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110
```

```
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365
```

```
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 180

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 180

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                   10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Arg Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95
```

```
Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350
```

```
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 181

<211> 470

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 181

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                   10                  15

Ala Cys Pro Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
            20                  25                  30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
        35                  40                  45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335
```

```
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 182

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CPS

<400> 182

```
Cys Pro Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1               5                   10                  15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
    50                  55                  60
```

```
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320
```

```
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
        355                 360                 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385                 390                 395                 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                 410                 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            420                 425                 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 183

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 183

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Pro Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60
```

```
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320
```

```
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 184

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 184

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                   10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Pro Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45
```

```
Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300
```

```
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 185

<211> 470

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 185

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                   10                  15

Ala Cys Pro Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
            20                  25                  30
```

```
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
        35                  40                  45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285
```

```
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 186

<211> 454

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CDKT

<400> 186

```
Cys Asp Lys Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
1               5                   10                  15
```

```
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
            20                  25                  30

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
        35                  40                  45

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
    50                  55                  60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
65                  70                  75                  80

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
                85                  90                  95

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270
```

```
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
        355                 360                 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 187

<211> 477

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 187

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                   10                  15
```

```
Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Lys Thr Glu Val Gln Leu Val
            20                  25                  30

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
        35                  40                  45

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
    50                  55                  60

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
65                  70                  75                  80

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
                85                  90                  95

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
            100                 105                 110

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
        115                 120                 125

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
    130                 135                 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
145                 150                 155                 160

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
                165                 170                 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
            180                 185                 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
        195                 200                 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
    210                 215                 220

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
225                 230                 235                 240

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270
```

```
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 188

<211> 477

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 188

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Lys Thr Glu Val Gln Leu Val
            20                  25                  30

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
        35                  40                  45

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val
    50                  55                  60

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro
65                  70                  75                  80

Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
                85                  90                  95

Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser
            100                 105                 110

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly
        115                 120                 125

Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
    130                 135                 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
145                 150                 155                 160

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
                165                 170                 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
            180                 185                 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
        195                 200                 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
    210                 215                 220

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
225                 230                 235                 240

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
                245                 250                 255
```

```
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
305                 310                 315                 320

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
                325                 330                 335

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
            340                 345                 350

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
        355                 360                 365

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
    370                 375                 380

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385                 390                 395                 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
                405                 410                 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
            420                 425                 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
        435                 440                 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    450                 455                 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 189

<211> 471

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 189

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Asp Lys Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
            20                  25                  30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
        35                  40                  45

Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
    50                  55                  60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
                85                  90                  95

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met
        115                 120                 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
            180                 185                 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                245                 250                 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            260                 265                 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        275                 280                 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    290                 295                 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305                 310                 315                 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                325                 330                 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            340                 345                 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        355                 360                 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
    370                 375                 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385                 390                 395                 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                405                 410                 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            420                 425                 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        435                 440                 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
    450                 455                 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 190

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CDKTHT

<400> 190

```
Cys Asp Lys Thr His Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
1               5                  10                  15

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
            20                  25                  30

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
        35                  40                  45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
    50                  55                  60

Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr
65                  70                  75                  80

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                85                  90                  95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala
            100                 105                 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
        115                 120                 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    130                 135                 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145                 150                 155                 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
                165                 170                 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
            180                 185                 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
        195                 200                 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
    210                 215                 220
```

```
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                245                 250                 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
            260                 265                 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
        275                 280                 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    290                 295                 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305                 310                 315                 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
                325                 330                 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
            340                 345                 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
        355                 360                 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    370                 375                 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385                 390                 395                 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                405                 410                 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            420                 425                 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 191

<211> 479

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 191

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Lys Thr His Thr Glu Val Gln
            20                  25                  30

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
        35                  40                  45

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
    50                  55                  60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
                85                  90                  95

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
            100                 105                 110

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
        115                 120                 125

Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    130                 135                 140

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
145                 150                 155                 160

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
                165                 170                 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
            180                 185                 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
        195                 200                 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
    210                 215                 220
```

```
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
225                 230                 235                 240

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
                245                 250                 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        435                 440                 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 192

<211> 479

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 192

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Lys Thr His Thr Glu Val Gln
            20                  25                  30

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
        35                  40                  45

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
    50                  55                  60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
                85                  90                  95

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
            100                 105                 110

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
        115                 120                 125

Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    130                 135                 140

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
145                 150                 155                 160

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
                165                 170                 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
            180                 185                 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
        195                 200                 205
```

```
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
    210                 215                 220

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
225                 230                 235                 240

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
                245                 250                 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        435                 440                 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 193

<211> 473

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 193

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Asp Lys Thr His Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
            20                  25                  30

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
        35                  40                  45

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
    50                  55                  60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr
65                  70                  75                  80

Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
                85                  90                  95

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
            100                 105                 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
        115                 120                 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
    130                 135                 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145                 150                 155                 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                165                 170                 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
            180                 185                 190
```

```
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
        195                 200                 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
    210                 215                 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
225                 230                 235                 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
                245                 250                 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
            260                 265                 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
        275                 280                 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
    290                 295                 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305                 310                 315                 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
                325                 330                 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
            340                 345                 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
        355                 360                 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
    370                 375                 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385                 390                 395                 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                405                 410                 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
        435                 440                 445
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
    450                 455                 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 194

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CVE

<400> 194

```
Cys Val Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1               5                  10                  15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
            20                  25                  30

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
        35                  40                  45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
    50                  55                  60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145                 150                 155                 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                165                 170                 175
```

```
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            180                 185                 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        195                 200                 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                 215                 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225                 230                 235                 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        275                 280                 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                 295                 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305                 310                 315                 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                325                 330                 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            340                 345                 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
        355                 360                 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                 375                 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385                 390                 395                 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                 410                 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            420                 425                 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 195

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 195

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Val Glu Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175
```

```
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 196

<211> 476

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 196

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                  10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Val Glu Glu Val Gln Leu Val Glu
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        35                  40                  45

Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr
65                  70                  75                  80

Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            100                 105                 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp
        115                 120                 125

Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
    130                 135                 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                165                 170                 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
            180                 185                 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    210                 215                 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
225                 230                 235                 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
            260                 265                 270

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
        275                 280                 285

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    290                 295                 300

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                325                 330                 335

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
            340                 345                 350

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
        355                 360                 365

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
    370                 375                 380

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
385                 390                 395                 400

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                405                 410                 415
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
            420                 425                 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
        435                 440                 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
    450                 455                 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 197

<211> 470

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 197

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                  10                  15

Ala Cys Val Glu Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
            20                  25                  30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn
        35                  40                  45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
                85                  90                  95

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140
```

```
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400
```

```
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 198

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de trastuzumab que tiene la secuencia N-terminal CDTPPP

<400> 198

```
Cys Asp Thr Pro Pro Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
1               5                   10                  15

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
            20                  25                  30

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
        35                  40                  45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
    50                  55                  60

Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr
65                  70                  75                  80

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                85                  90                  95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala
            100                 105                 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
        115                 120                 125
```

```
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    130                 135                 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145                 150                 155                 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
                165                 170                 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
            180                 185                 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
        195                 200                 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
    210                 215                 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                245                 250                 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
            260                 265                 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
        275                 280                 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    290                 295                 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305                 310                 315                 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
                325                 330                 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
            340                 345                 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
        355                 360                 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    370                 375                 380
```

```
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385                 390                 395                 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                405                 410                 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            420                 425                 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 199

<211> 479

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de SHH

<400> 199

```
Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Asp Thr Pro Pro Pro Glu Val Gln
            20                  25                  30

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
        35                  40                  45

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
    50                  55                  60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
                85                  90                  95

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
            100                 105                 110

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
        115                 120                 125
```

```
Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    130                 135                 140

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
145                 150                 155                 160

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
                165                 170                 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
            180                 185                 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
        195                 200                 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
    210                 215                 220

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
225                 230                 235                 240

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
                245                 250                 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380
```

```
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        435                 440                 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 200

<211> 479

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de IFN

<400> 200

```
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1               5                   10                  15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Thr Pro Pro Pro Glu Val Gln
            20                  25                  30

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
        35                  40                  45

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
    50                  55                  60

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
65                  70                  75                  80

Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
                85                  90                  95

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
            100                 105                 110
```

```
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
        115                 120                 125

Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    130                 135                 140

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
145                 150                 155                 160

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
                165                 170                 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
            180                 185                 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
        195                 200                 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
    210                 215                 220

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
225                 230                 235                 240

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
                245                 250                 255

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365
```

```
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        435                 440                 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 201

<211> 473

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico pre-cadena pesada que tiene péptido señal de CETP

<400> 201

```
Met Leu Ala Ala Thr Val Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Ala His
1               5                   10                  15

Ala Cys Asp Thr Pro Pro Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
            20                  25                  30

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
        35                  40                  45

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
    50                  55                  60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr
65                  70                  75                  80

Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
                85                  90                  95
```

```
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
            100                 105                 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
        115                 120                 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
    130                 135                 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145                 150                 155                 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                165                 170                 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
            180                 185                 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
        195                 200                 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
    210                 215                 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
225                 230                 235                 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
                245                 250                 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
            260                 265                 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
        275                 280                 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
    290                 295                 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305                 310                 315                 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
                325                 330                 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
            340                 345                 350
```

```
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
        355                 360                 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
    370                 375                 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385                 390                 395                 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                405                 410                 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
            420                 425                 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
        435                 440                 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
    450                 455                 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 202

<211> 31

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 202

```
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1               5                   10                  15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
            20                  25                  30
```

<210> 203

<211> 22

<212> ADN

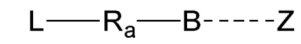
<213> *Homo sapiens*

<400> 203

agaggtagta ggttgcatag tt 22

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:



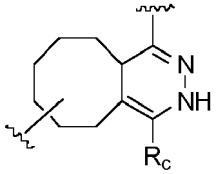
en la que Z es un componente de proteína del compuesto, componente de proteína que comprende uno o más polipéptidos, en el que al menos uno de los uno o más polipéptidos comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una cisteína o una selenocisteína;

en la que B es un residuo de ácido orgánico, o un tramo de 1-50 residuos de aminoácido que une R_a y Z;

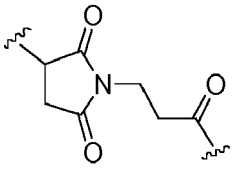
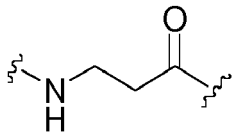
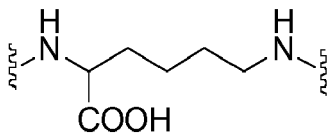
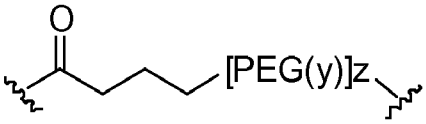
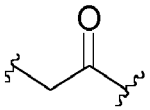
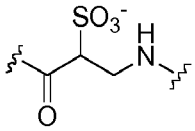
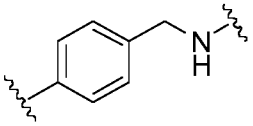
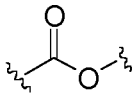
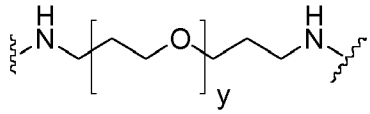
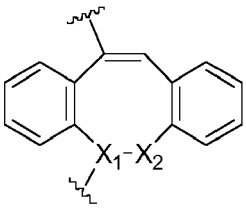
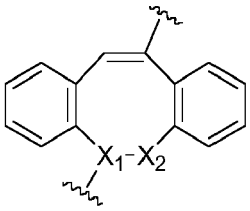
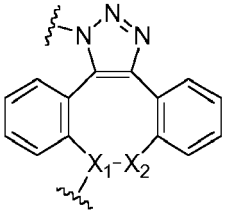
en la que la línea discontinua entre B y Z representa una unión peptidilo entre una cisteína o selenocisteína N-terminal de un polipéptido de Z y un residuo de aminoácido o un residuo de ácido orgánico de B;

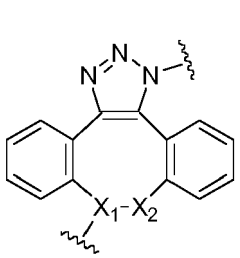
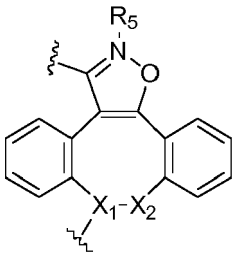
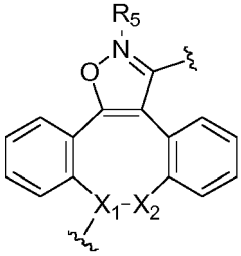
en la que L se selecciona del grupo que consiste en: una tetrazina y un trans-cicloocteno; y

en el que R_a es un enlace o una estructura orgánica que consiste en una cadena de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos, en el que cada resto se selecciona independientemente del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina, un



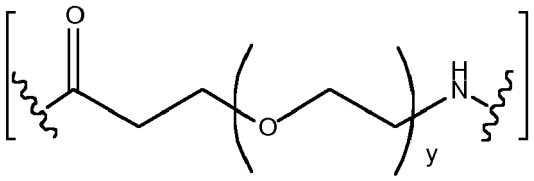
dibenzociclooctenо, un dibenzoazaciclooctenо,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


, 
y 
;

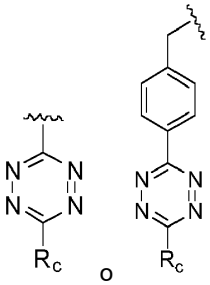
en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en el que [PEG(y)]z es:

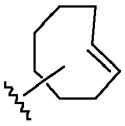
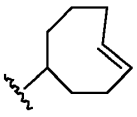

;

en el que y = 1-100 y z = 1-10.

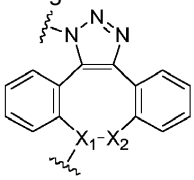
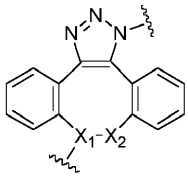
2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que L es una tetrazina, y la tetrazina tiene la estructura:


o
, en la que R_c es H, alquilo o arilo.

3. El compuesto según la reivindicación 1, en el que L es trans-cicloocteno, y el trans-cicloocteno tiene la estructura:


o 
.

4. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que B es un tramo de 1-50 residuos de aminoácido en la secuencia EPKSCDKTHTCPPCP, ERKCCVECPPCP, ELKTPLGDTTHTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)3, o ESKYGPPCPSCP.

5. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R_a es una estructura orgánica que comprende 
o 
, preferiblemente en el que X_1 es CH o N y X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo.

6. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que R_a

i) es una estructura orgánica que comprende un grupo [PEG(y)]z;

ii) es una estructura orgánica que comprende un grupo polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico) o polisacárido;

iii) es una estructura orgánica que comprende un grupo alquilo C_1-C_4;

iv) es una estructura orgánica que comprende una succinimida;

v) es una estructura orgánica que comprende una amina;

vi) es una estructura orgánica que comprende un succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo o adipoílo;

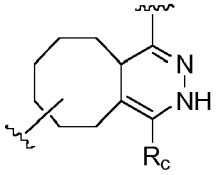
vii) es una estructura orgánica que comprende un malonilo;

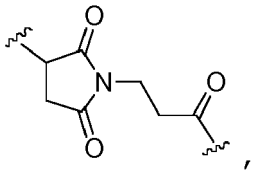
viii) es una estructura orgánica que comprende un aminoácido;

ix) es una estructura orgánica que comprende una cisteína;

x) es una estructura orgánica que comprende una lisina;

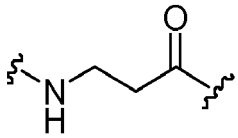
xi) es una estructura orgánica que consiste en una cadena de 3 restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina,

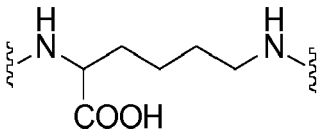


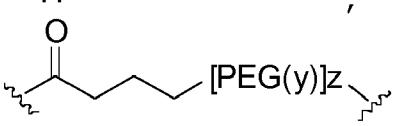
,


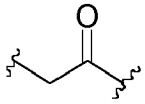
,

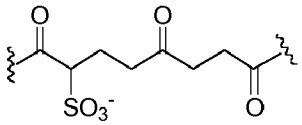
un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

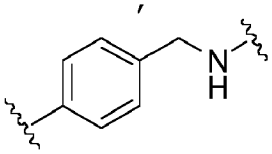


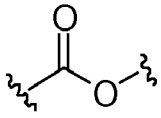
,


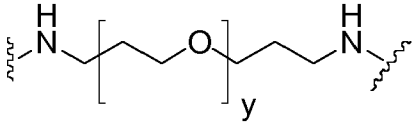
,


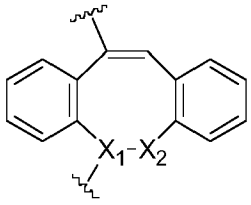
,


,


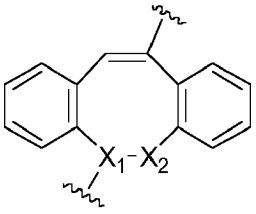
,


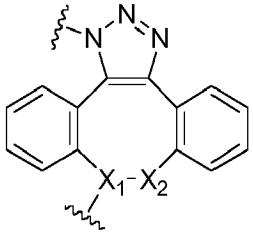
,


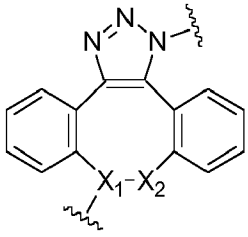
,


,


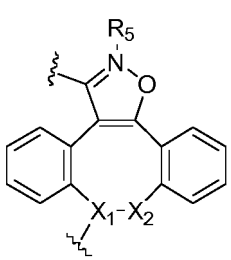
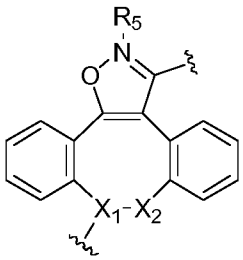
,



,


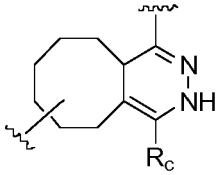
,


,

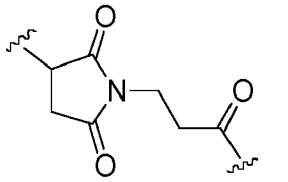
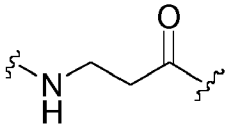
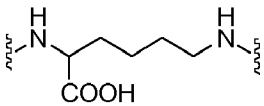
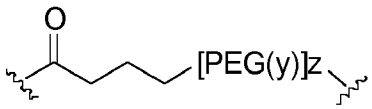
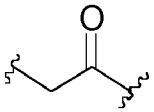
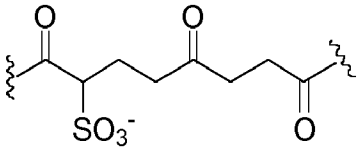
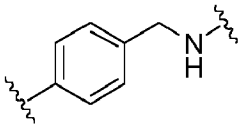
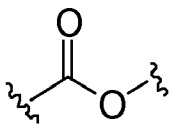
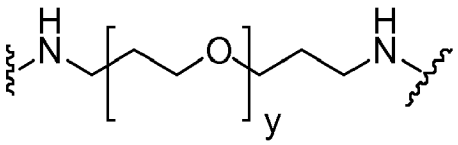
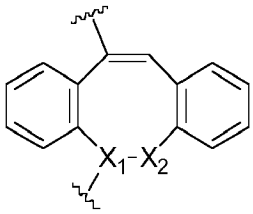
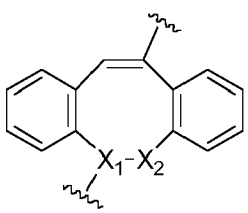
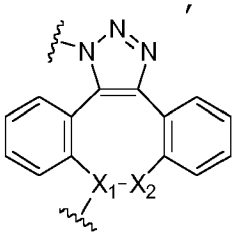
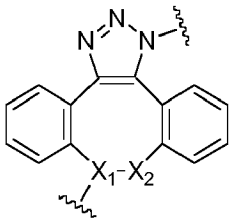



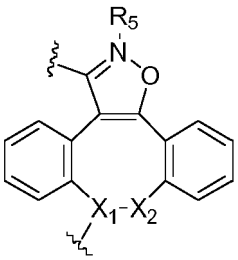
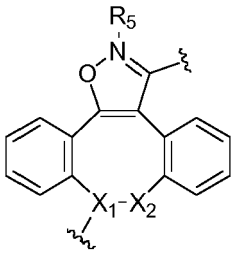
y ;

xii) es una estructura orgánica que consiste en una cadena de cuatro restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina,



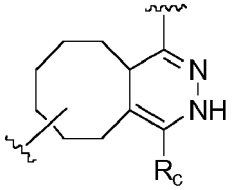
un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

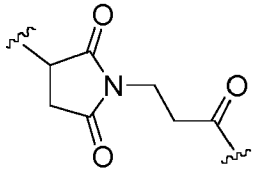
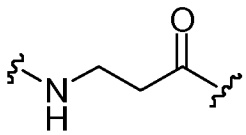
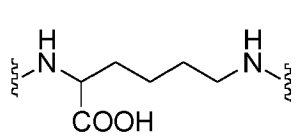



y ;

xiii) es una estructura orgánica que consiste en una cadena de cinco restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, polialquilenglicol, poliol polioxialquilado, poli(alcohol vinílico), poli(vinil alquil éter), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), polisacárido, un residuo ramificado, alquilo C_1-C_{10}, cicloalcano C_3-C_{10}, alqueno C_2-C_{10}, cicloalqueno C_5-C_{10}, amina, azufre, oxígeno, succinimida, maleimida, glicerol, triazol, isoxazolidina, acilo C_2-C_5, acilamino C_2-C_5, aciloxilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, ftalilo, adipoílo, un aminoácido, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un carbamato, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a una isoxazolidina,

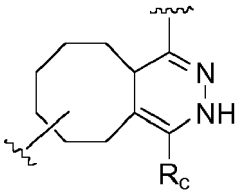


un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,

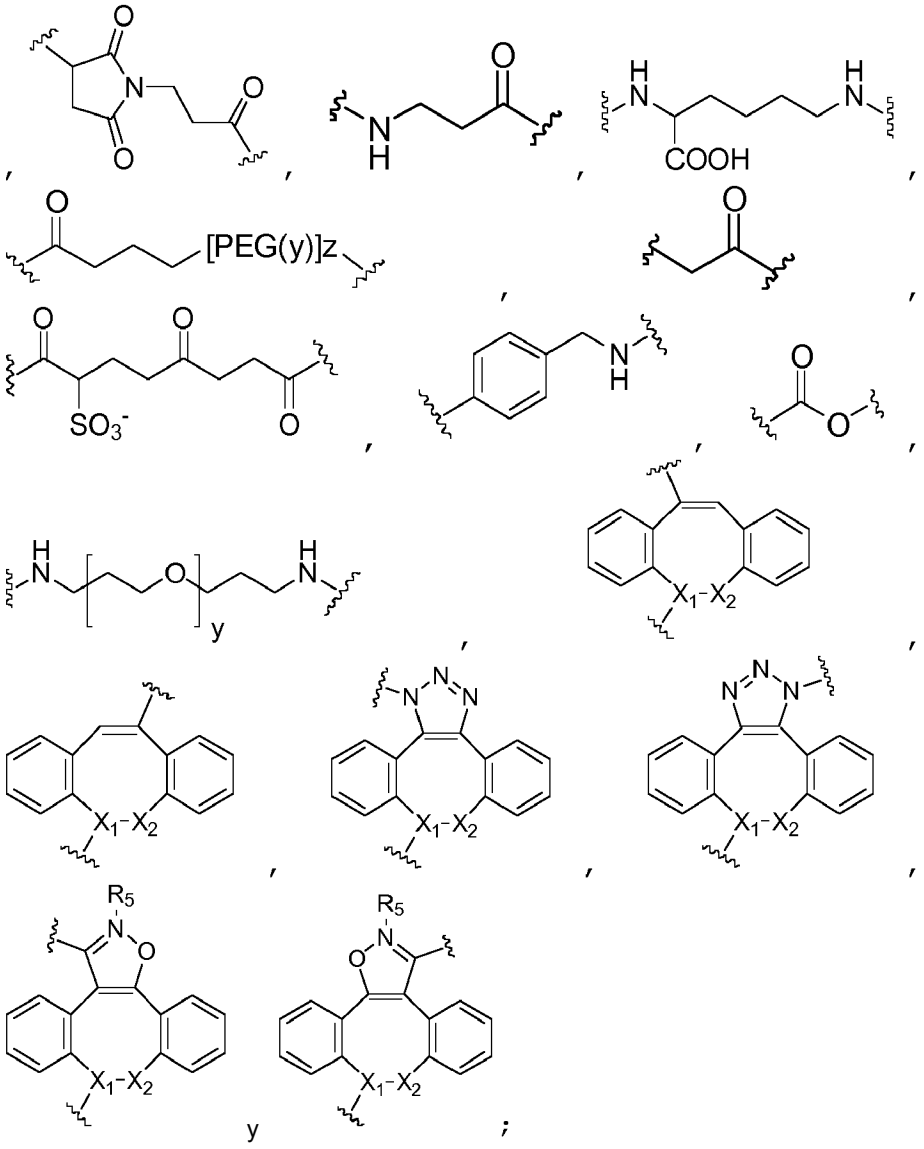




xvii) comprende un grupo [PEG(y)]z, que está unido a un glutarilo;

xviii) es una estructura orgánica que consiste en una cadena de tres, cuatro o cinco restos seleccionados del grupo que consiste en [PEG(y)]z, acilo C_2-C_5, succinilo, malonilo, glutarilo, un aminoácido, una estructura química que contiene un ciclooctano condensado a una dihidropiridazina, una estructura química que contiene un cicloocteno condensado a un triazol, una estructura química que contiene un cicloocteno

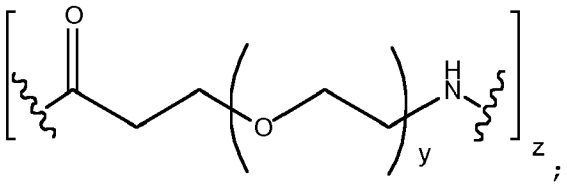


condensado a una isoxazolidina, un dibenzociclooctено, un dibenzoazaciclooctено,



en los que X_1 es CH o N, X_2 es CH_2 o un grupo carbonilo, y R_5 es un grupo arilo o alquilo;

en los que [PEG(y)]z es:



;

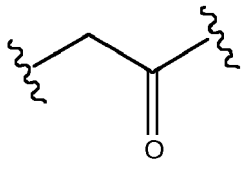
en el que y = 1-100 y z = 1-10;

ixx) es un enlace;

xx) es una cisteína;

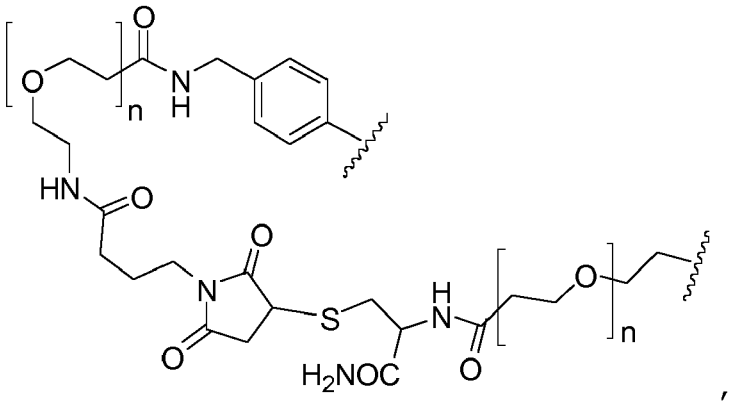
xxi) tiene una estructura lineal; o

xxii) tiene una estructura ramificada;



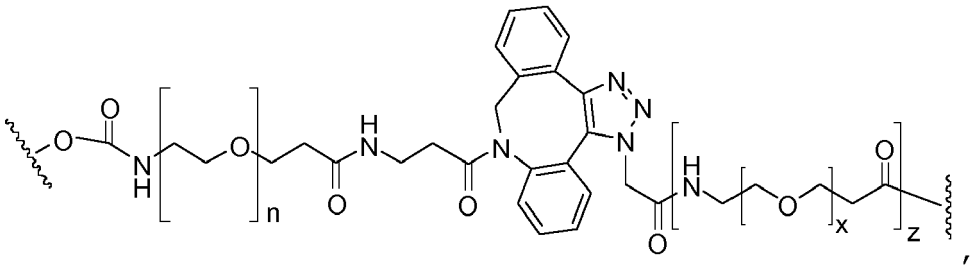
xxiii) tiene la estructura: ;

xxiv) es:



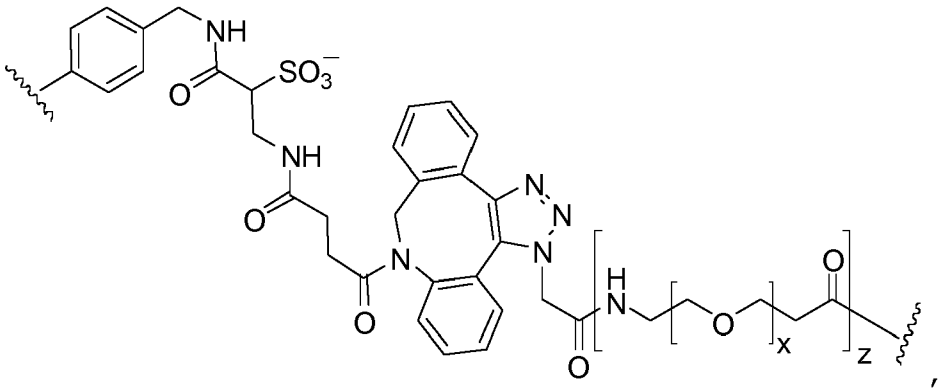
en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50;

xxv) es:



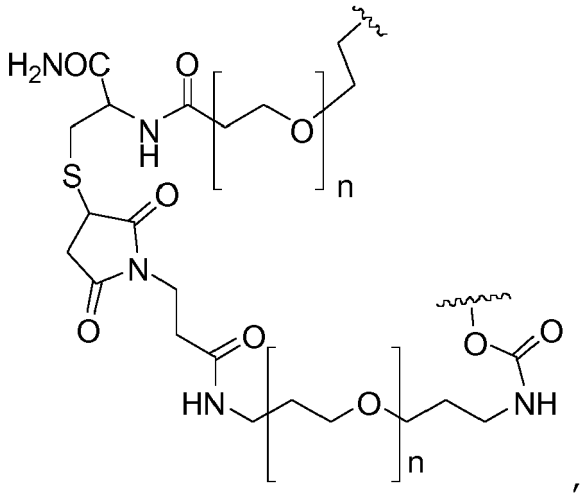
en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50, x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50 y z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50;

xxvi) es:



en el que x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50 y z es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50; o

xxvii) es:



en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1-30, 1-40 o 1-50.

7. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que Z

i) comprende un anticuerpo o una porción del mismo;

ii) comprende al menos un Fab o Fab' de un anticuerpo, o una porción del al menos un Fab o Fab'

iii) comprende Fab-1 o Fab'1, o una porción del mismo de un anticuerpo;

iv) comprende Fab-2 o Fab'2, o una porción del mismo de un anticuerpo;

v) comprende dos manos de Fab o Fab' de un anticuerpo; o

vi) comprende al menos un tramo de aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en un anticuerpo de cadena sencilla.

8. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que Z comprende un C, en el que C es un primer polipéptido, primer polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cisteína, selenocisteína, CP, CPXCP (en la que X = P, R o S), CDKTHTCPPCP, CVECPPCP, CCVECPPCP y CDTPPPCPRCP.

9. El compuesto según las reivindicaciones 8, en el que C

i) comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una secuencia que comprende una cisteína que se produce de manera natural seleccionada del grupo que consiste en CP, CPXCP (en la que X = P, R o S), CDKTHTCPPCP, CVECPPCP,

CCVECPPCP y CDTPPPCPRCP;

ii) es un componente de polipéptido del compuesto, componente de polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que (i) son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo; (ii) se unen a un receptor de Fc; y (iii) tienen en su extremo N-terminal una secuencia que comprende una cisteína que no se produce de manera natural o selenocisteína;

iii) comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena de un dominio Fc de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en IgG, IgM, IgA, IgD e IgE;

iv) comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena de un dominio Fc6 de un anticuerpo;

v) comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un anticuerpo distinta de una cadena de un dominio Fc del anticuerpo;

vi) comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena pesada de un Fab o un Fab' de un anticuerpo; o

vii) comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena ligera de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

10. El compuesto según la reivindicación 8 o 9, en el que Z comprende además un segundo polipéptido, segundo polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un anticuerpo distinta de una cadena de un dominio Fc del anticuerpo, preferiblemente en el que el segundo polipéptido comprende

i) aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena pesada de un Fab o un Fab' de un anticuerpo; o

ii) aminoácidos consecutivos que son idénticos a un tramo de aminoácidos consecutivos presente en la cadena ligera de un Fab o un Fab' de un anticuerpo.

11. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el extremo C-terminal de C

i) comprende un tramo de aminoácidos consecutivos presente en una cadena de un dominio Fc de un anticuerpo que se ha modificado; o

ii) es una cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína, o un derivado de cisteína, selenocisteína, homocisteína u homoselenocisteína.

12. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que:

i) B está unido a C mediante una unión peptidilo entre la cisteína o selenocisteína N-terminal de C y un residuo de aminoácido o un residuo de ácido orgánico de B; o

ii) Z comprende un segundo polipéptido, y B está unido a Z mediante una unión peptidilo entre la cisteína o selenocisteína N-terminal del segundo polipéptido de Z y un residuo de aminoácido o un residuo de ácido orgánico de B.

13. Un homodímero o heterodímero que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

14. El homodímero o heterodímero según la reivindicación 13, en el que cada compuesto del homodímero o heterodímero

i) puede unirse al otro mediante al menos un enlace disulfuro;

ii) está unido al otro mediante al menos un enlace disulfuro.

15. Un homodímero o heterodímero que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que

i) cada compuesto del homodímero o heterodímero puede unirse al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el C de cada compuesto;

ii) Z comprende un segundo polipéptido y cada compuesto del homodímero o heterodímero puede unirse al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el C o el segundo polipéptido de cada compuesto;

iii) cada compuesto del homodímero o heterodímero está unido al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el C de cada compuesto; o

iv) Z comprende un segundo polipéptido y cada compuesto del homodímero o heterodímero está unido al otro mediante al menos un enlace disulfuro entre el C o el segundo polipéptido de cada compuesto.

5

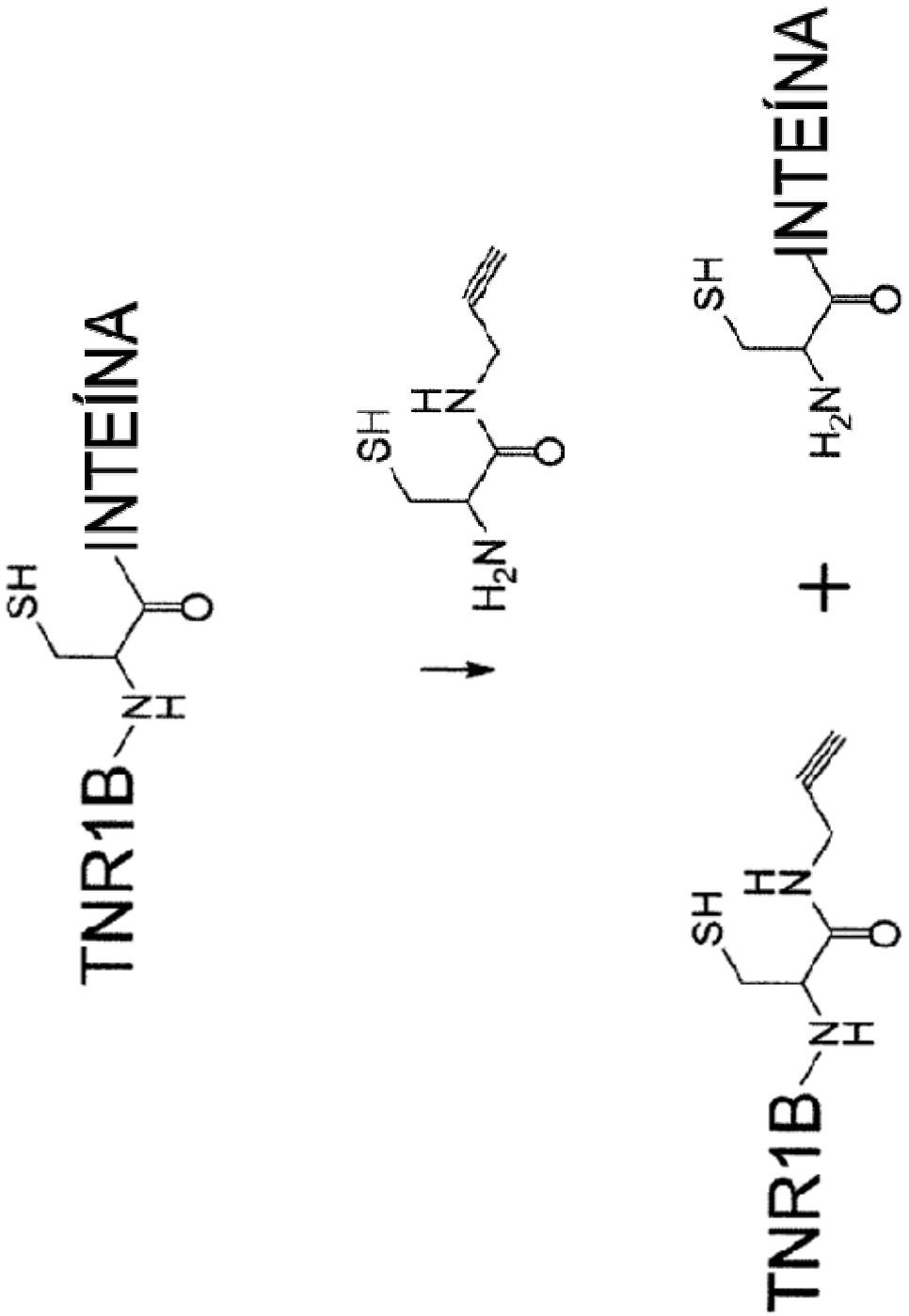


Figura 1

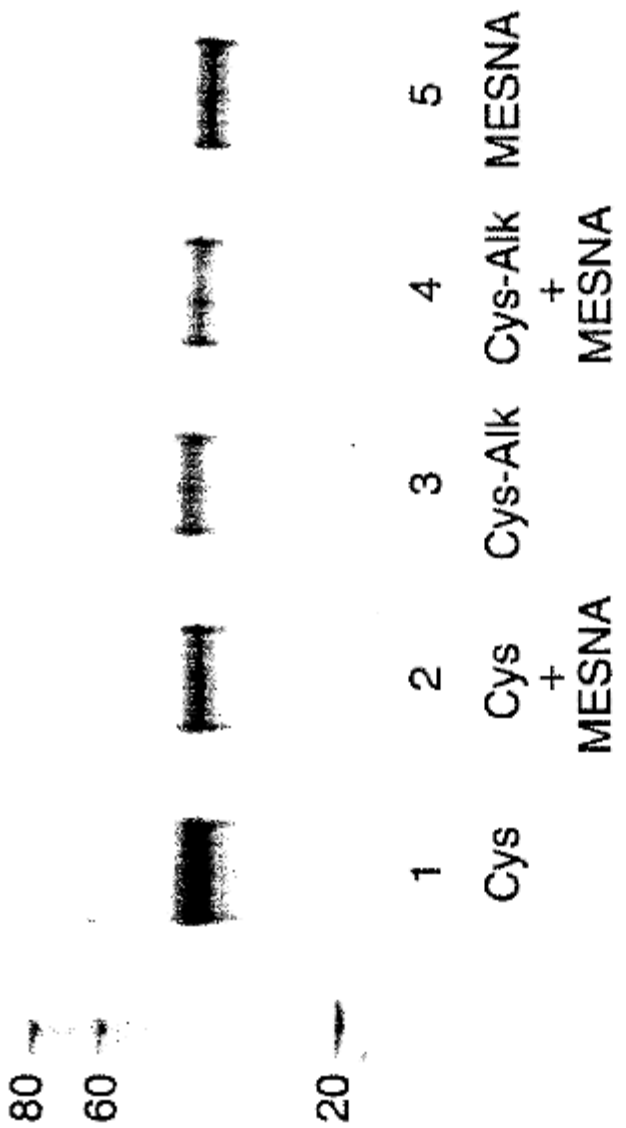


Figura 2

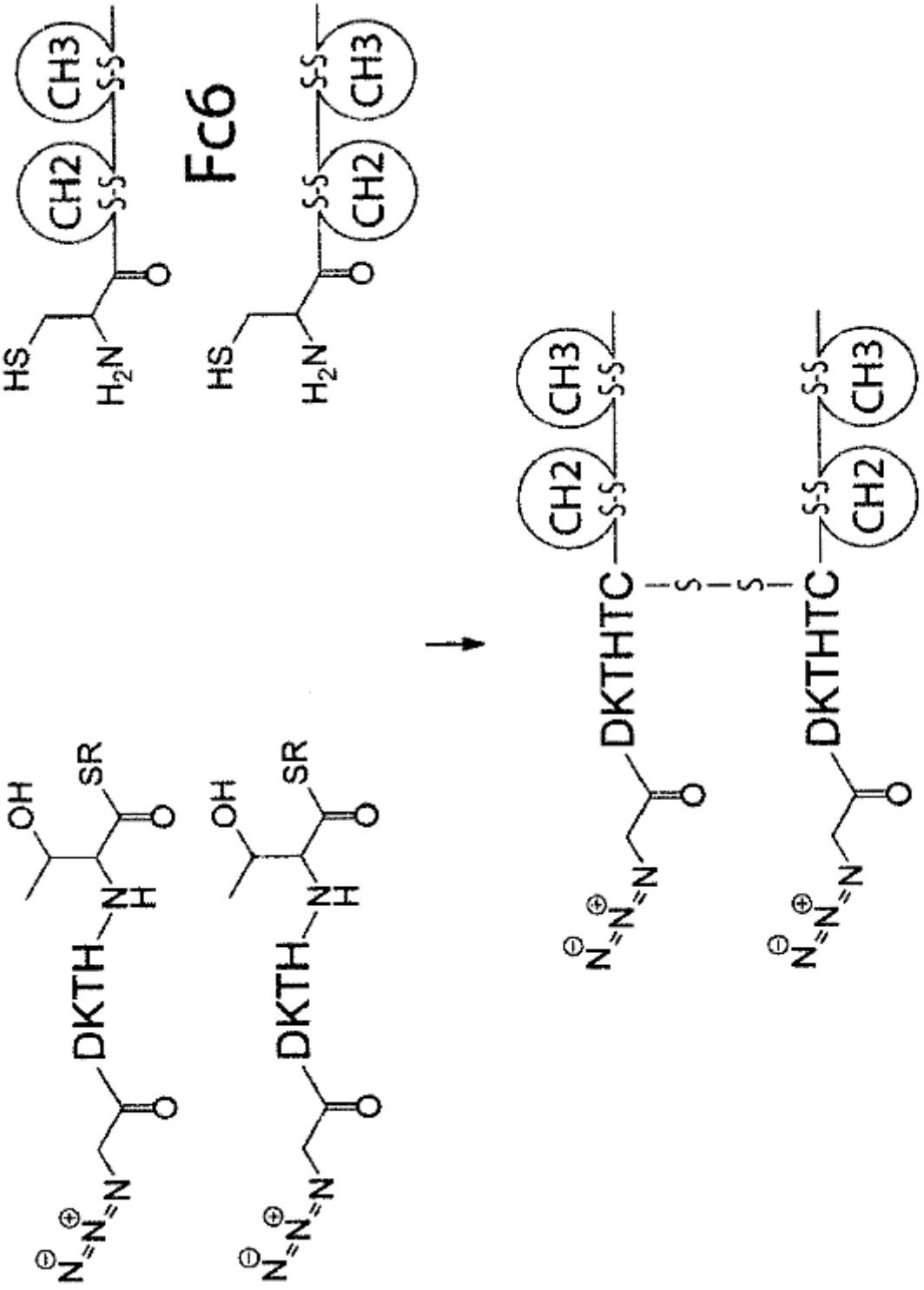


Figura 3

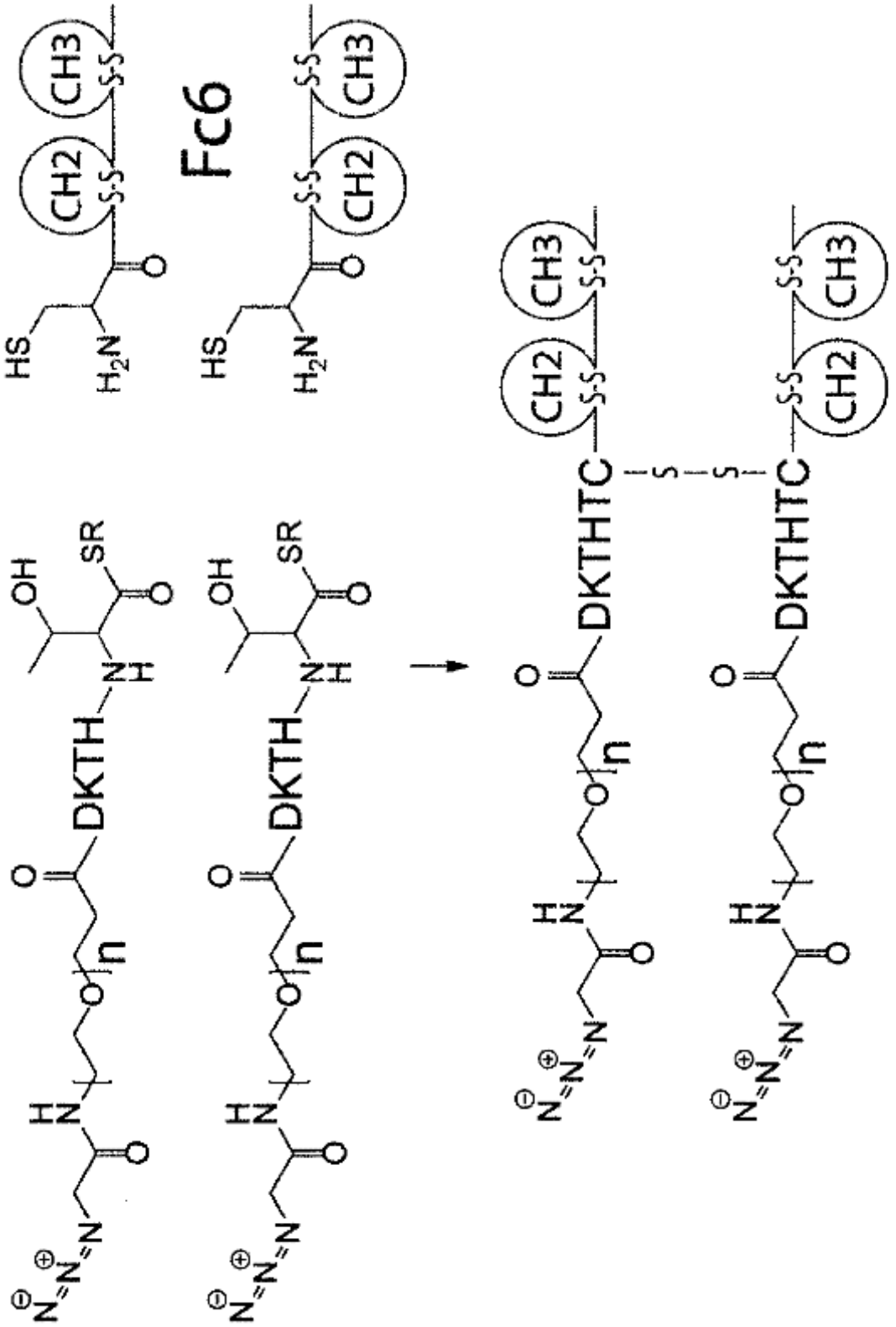


Figura 4

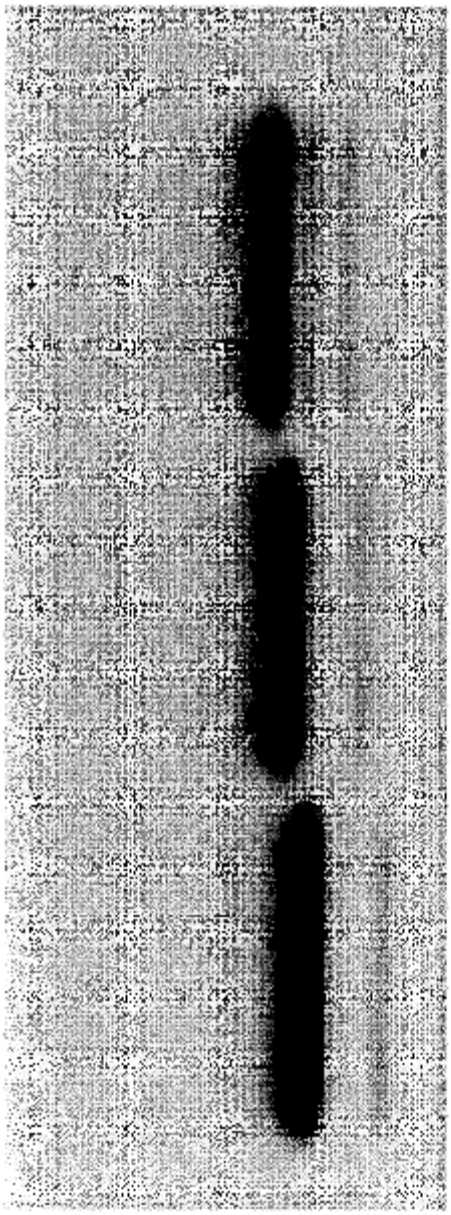


Figura 5

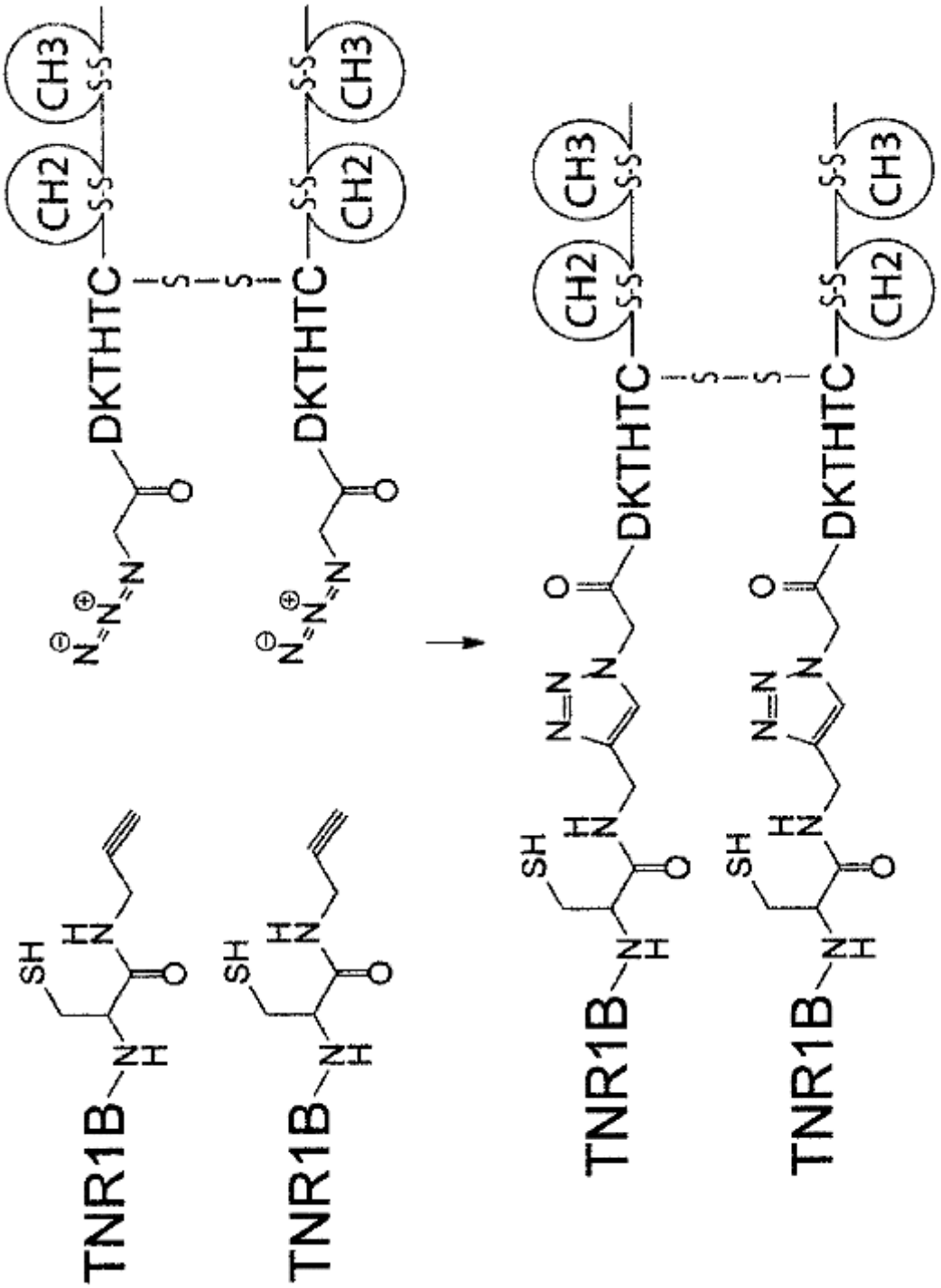


Figura 6

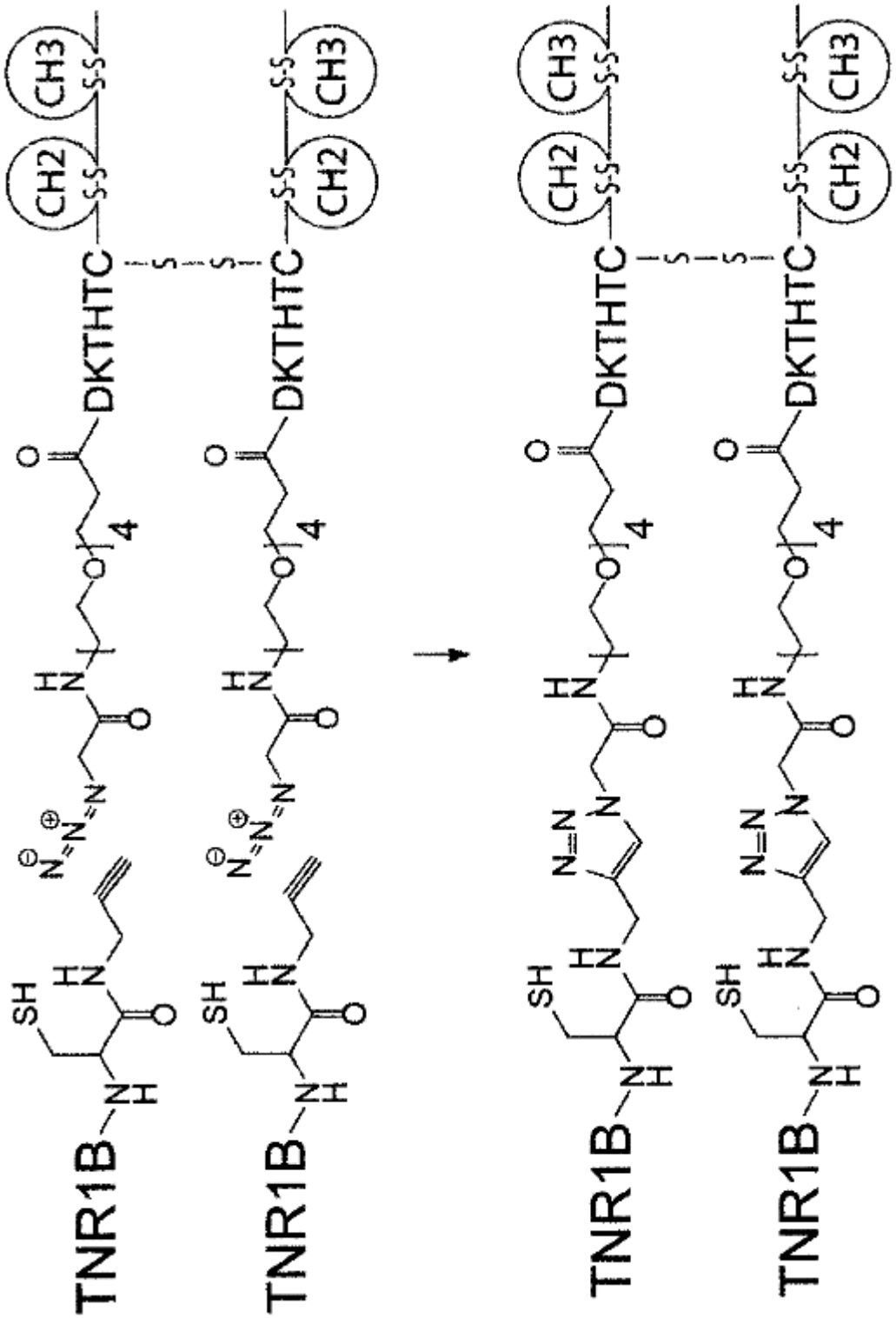


Figura 7

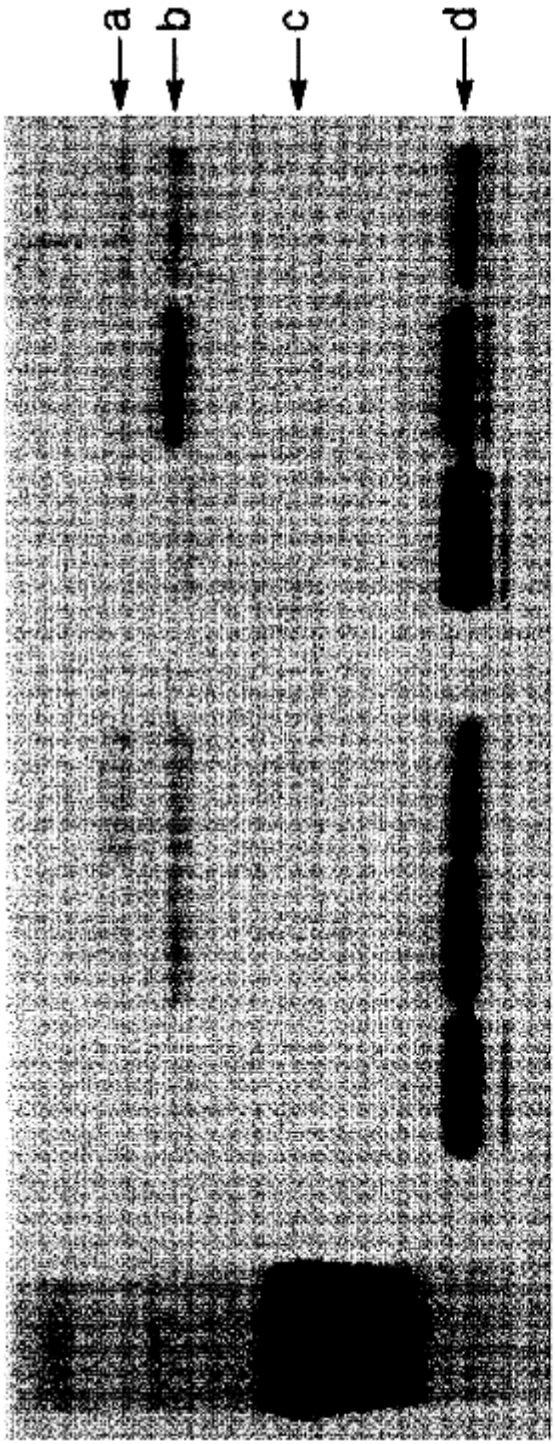

a
b
c
d
1
2
3
4
5
6
7
TNR1B-Alk
TNR1B-Alk
+
Az-DKTHT-Fc6
TNR1B-Alk
+
Az-PEG4-DKTHT-Fc6

Figura 8

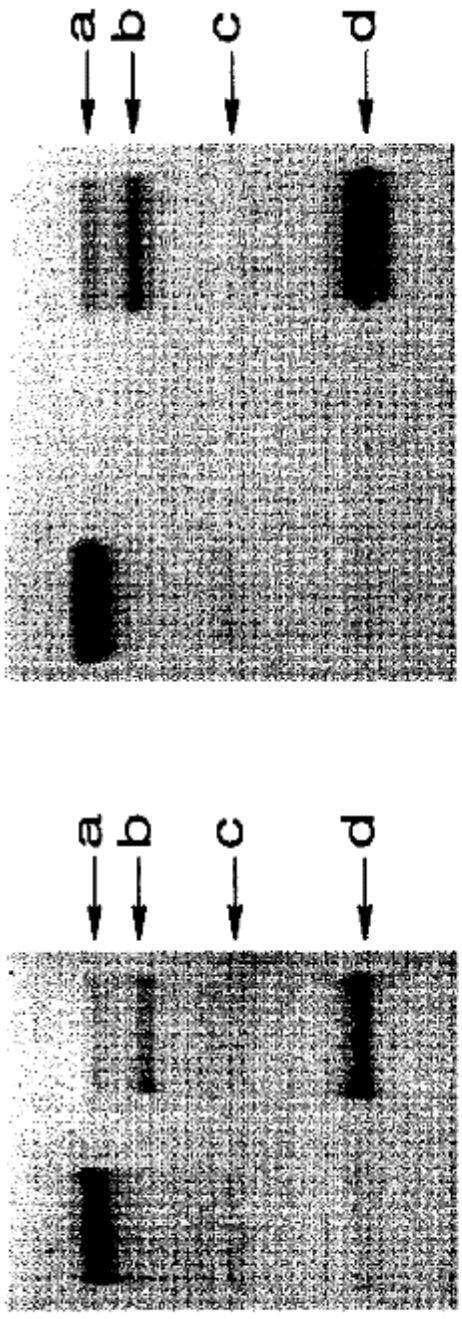

a
b
c
d
1
2
TNR1B-Fc
TNR1B-Alk
+
Az-DKTHT-Fc6
a
b
c
d
3
4
TNR1B-Fc
TNR1B-Alk
+
Az-PEG4-DKTHT-Fc6

Figura 9

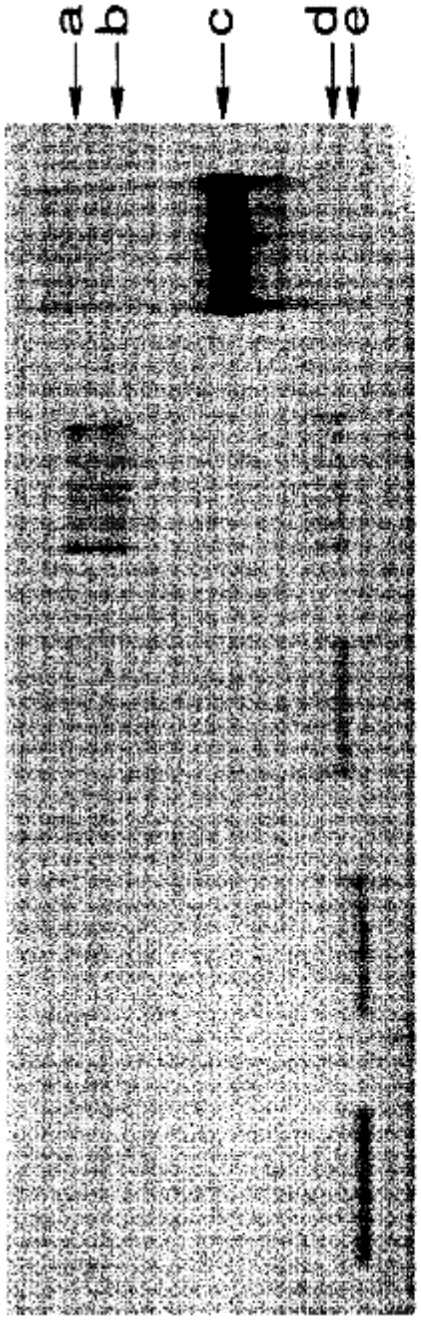

a
b
c
d
e
1
2
3
4
5
Fc6
Fc6 + TNR1B-Alk
Az-DKTHT-Fc6
Az-DKTHT-Fc6 + TNR1B-Alk
TNR1B-Alk

Figura 10

TNR1B

LPAQVAFTPY APEPGSTCRL R**EYYDQTAQM CCSK**CSPGQH

AKVFCTKTSD TVCDSCEDST YTQLWNWVPE CLSCGSR**CSS**

DQVETQACTR EQNRICTCRP GWYCALSKQE GCRLCAPLRK

CRPGFGVARP GTETSDVVCK PCAPGTFSNT TSSTDICRPH

QICNVVAIPG NASMDAVCTS TSPTR**SMAPG AVHLPQPVST**

RSQHTQPTPE PSTAPSTSFL LPMGPSPPAE GSTGDGC

Fc6

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPK**DTLMISR** TPEVTCVVVD

VSHEDPEVK**F NWYVDGVEVH NAK**TKPREEQ YNSTYR**VVSV**

LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPR**E**

PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG

QPENNYK**TTP PVLDSDGSFF LYSK**LTVDKS RWQQGNVFSC

SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

TNR1B-Alk-Az-DKTHT-Fc6

Figura 11

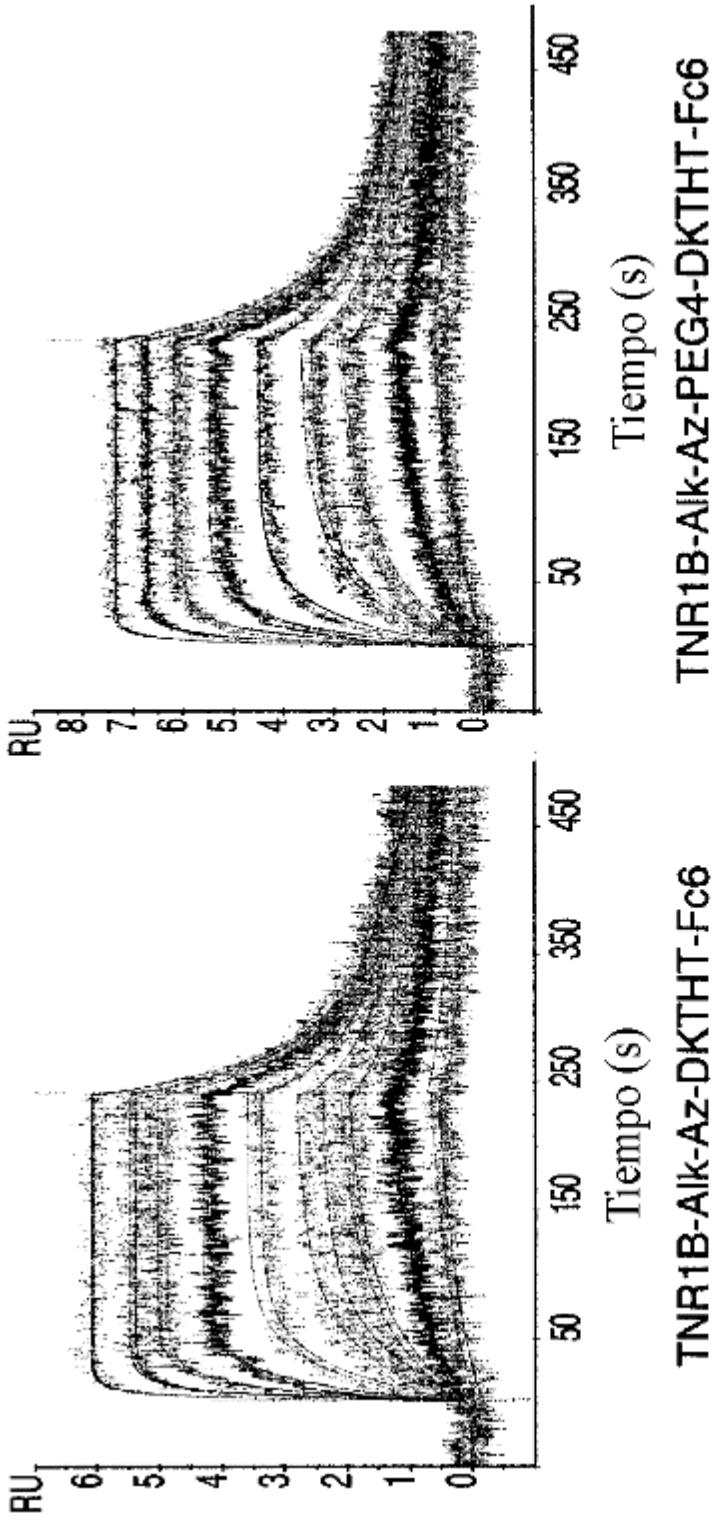

RU
Tiempo (s)
TNR1B-Alk-Az-DKTHT-Fc6
RU
Tiempo (s)
TNR1B-Alk-Az-PEG4-DKTHT-Fc6

Figura 12

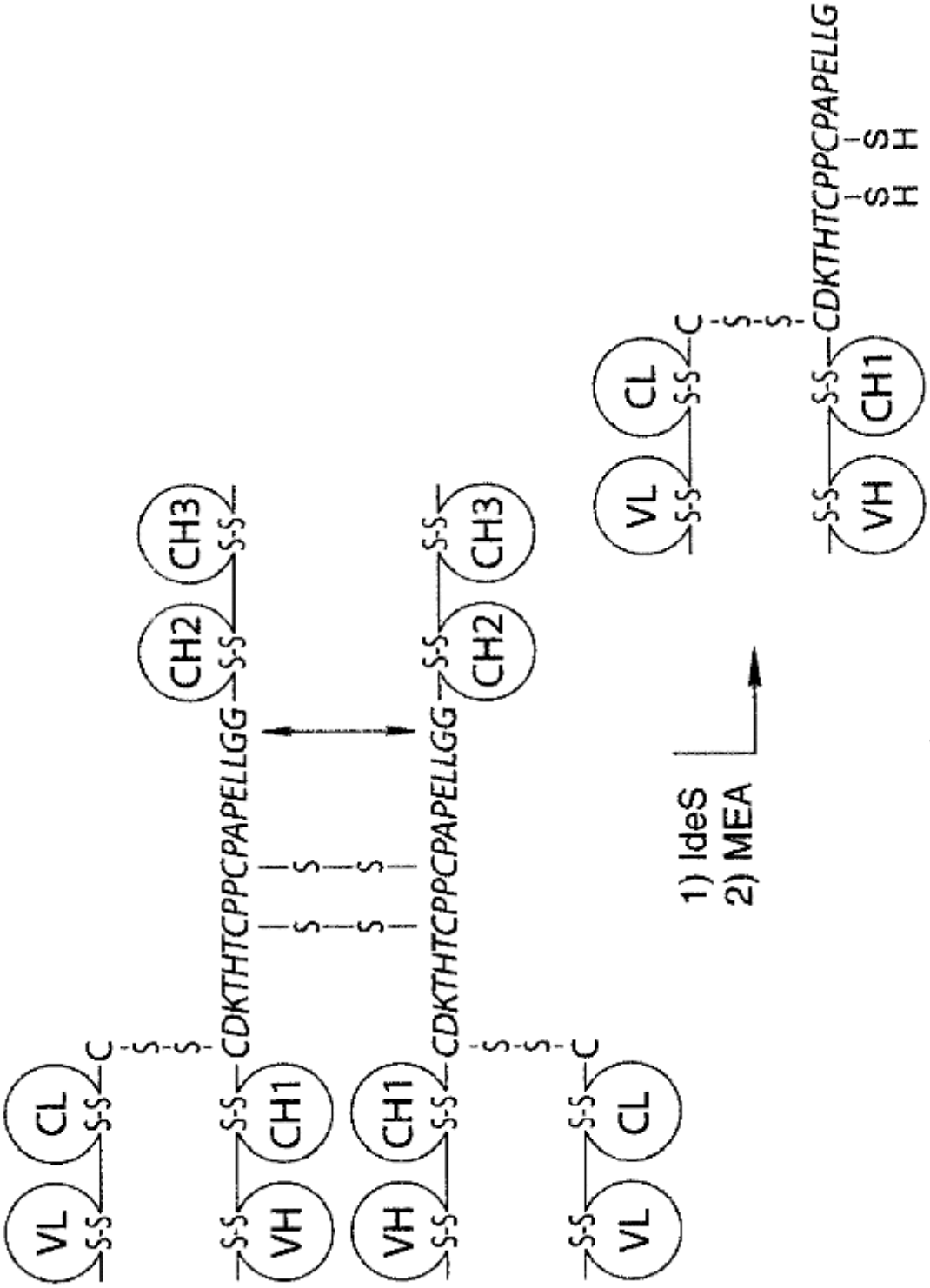

VL
CL
C
CDKTHTCPPCPAPELLGG
CH2
CH3
VH
CH1
1) IdeS
2) MEA
CDKTHTCPPCPAPELLG
S
H

Figura 13

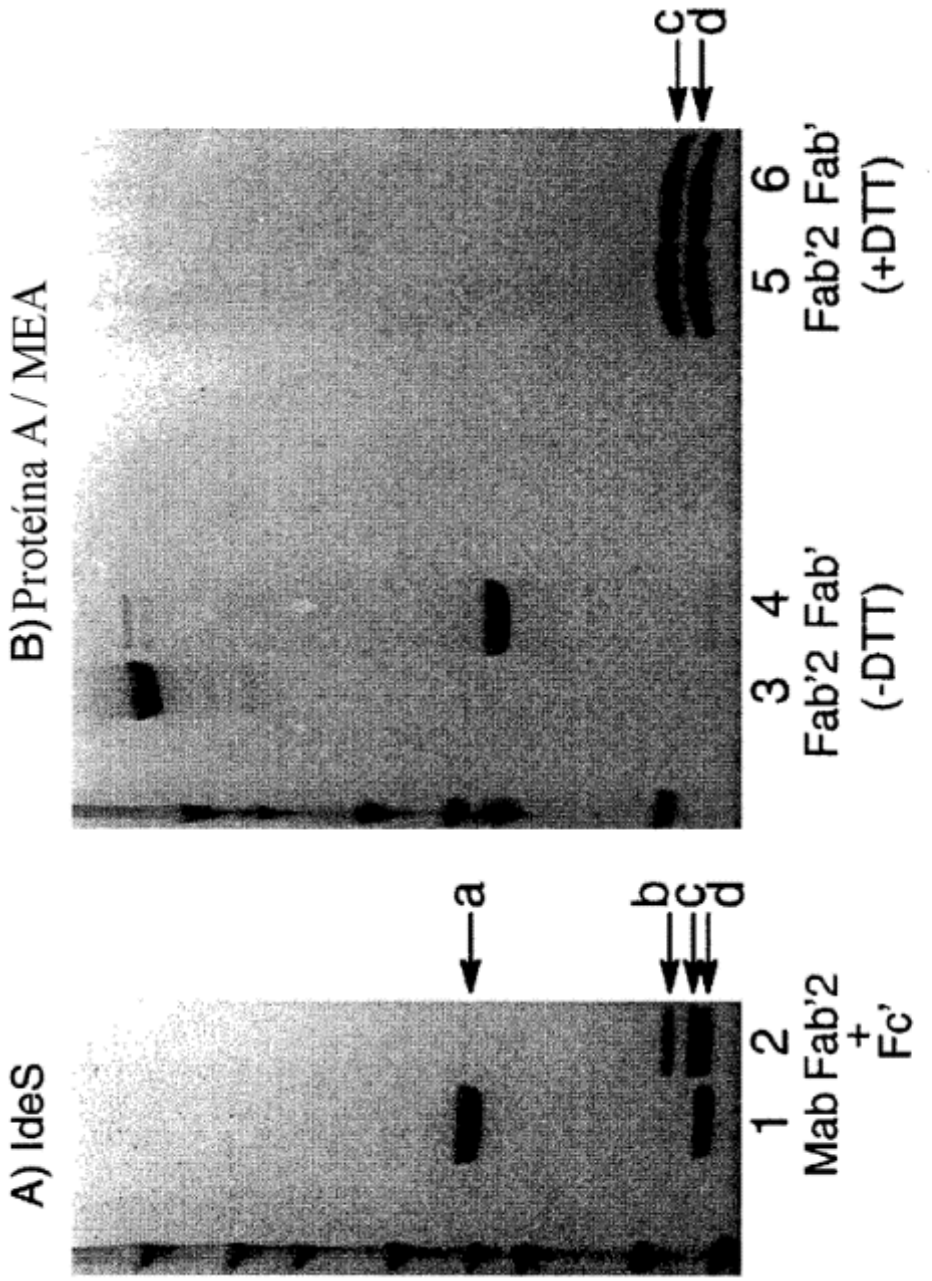

A) IdeS
a
b
c
d
1 2
Mab Fab'2
+
Fc'
B) Proteína A / MEA
c
d
3 4
Fab'2 Fab'
(-DTT)
5 6
Fab'2 Fab'
(+DTT)
Adalimumab-Fab'

Figura14

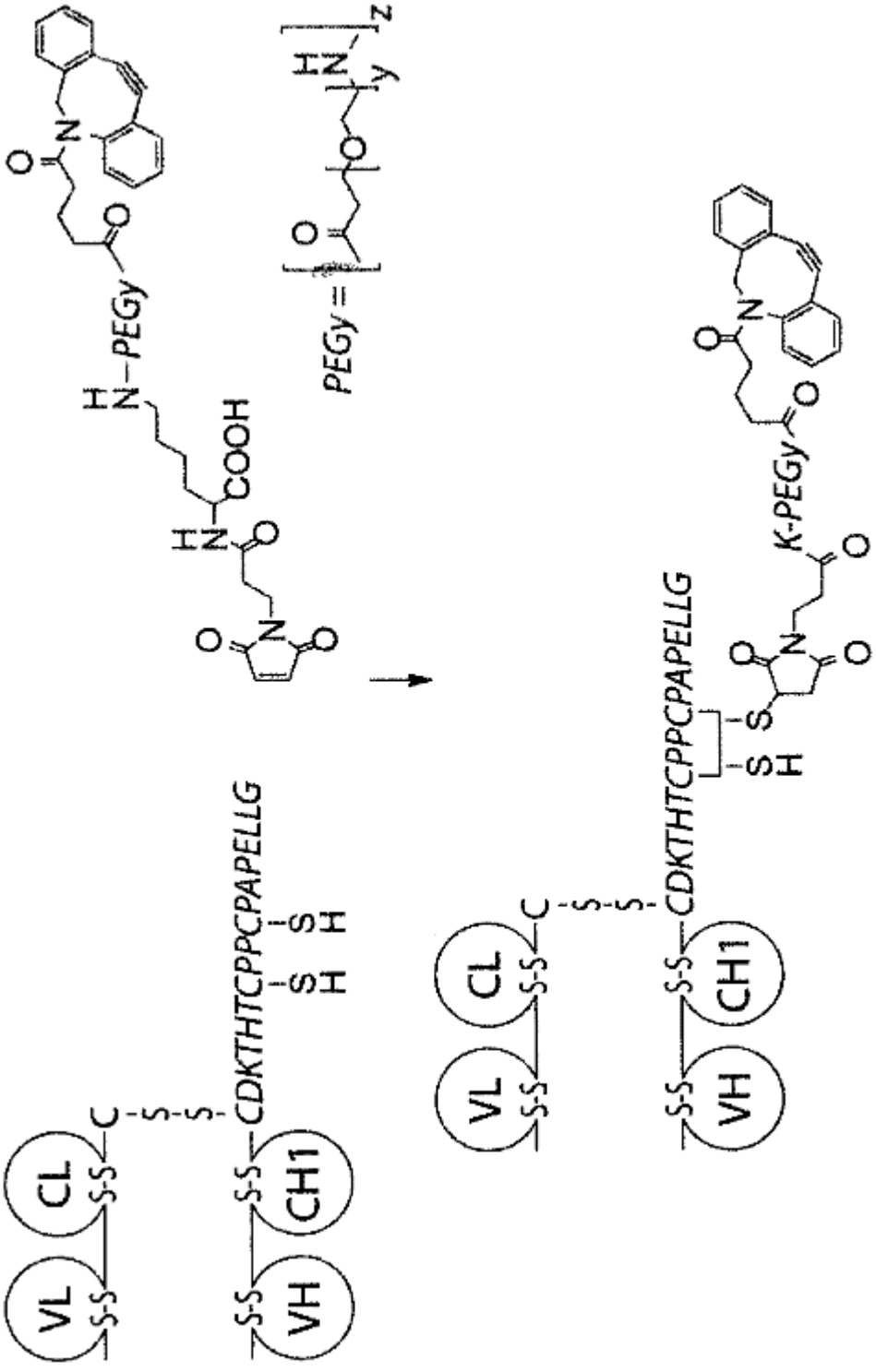


Figura15

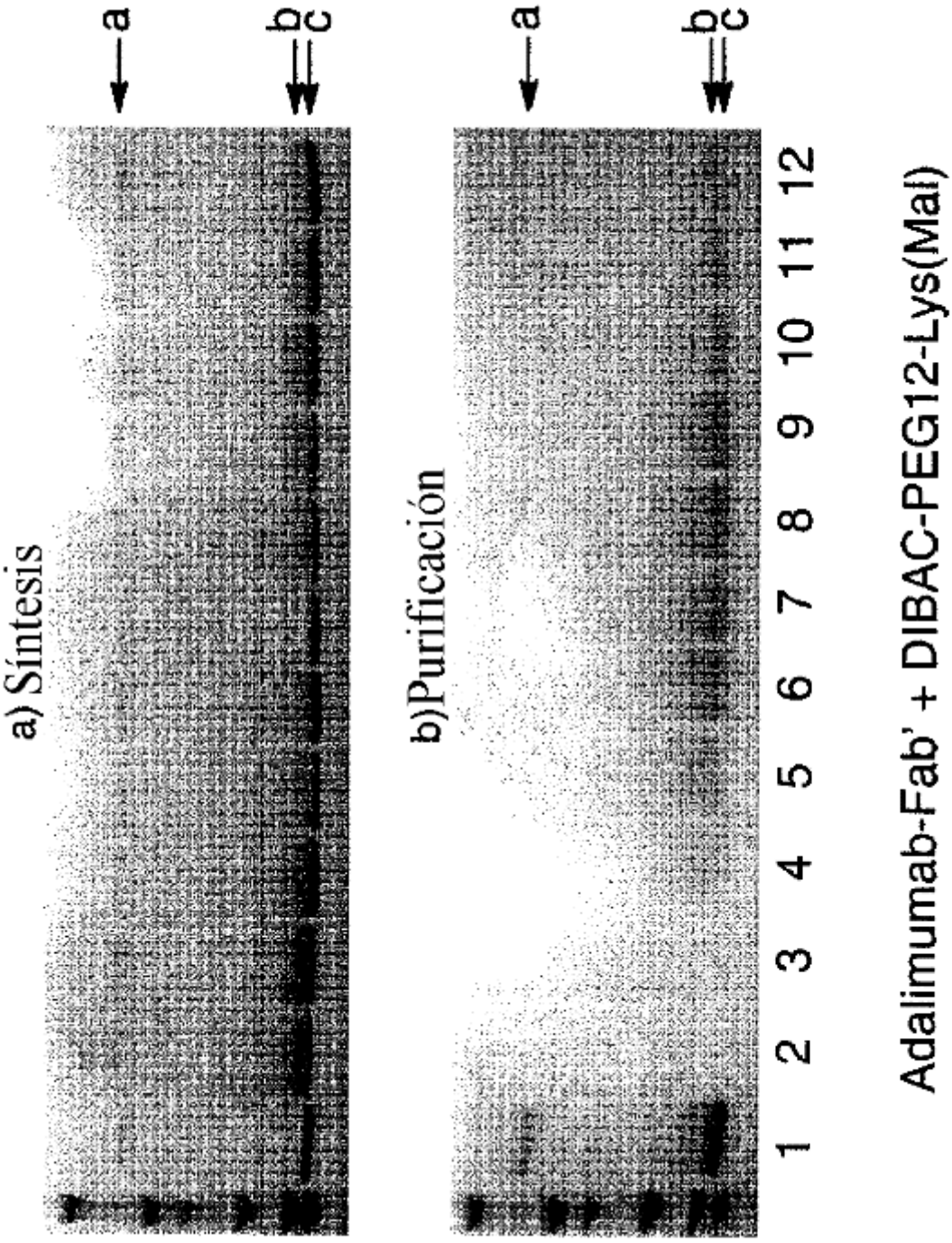

a) Síntesis
a
b
c
b)Purificación
a
b
c
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Adalimumab-Fab' + DIBAC-PEG12-Lys(Mal)

Figura16

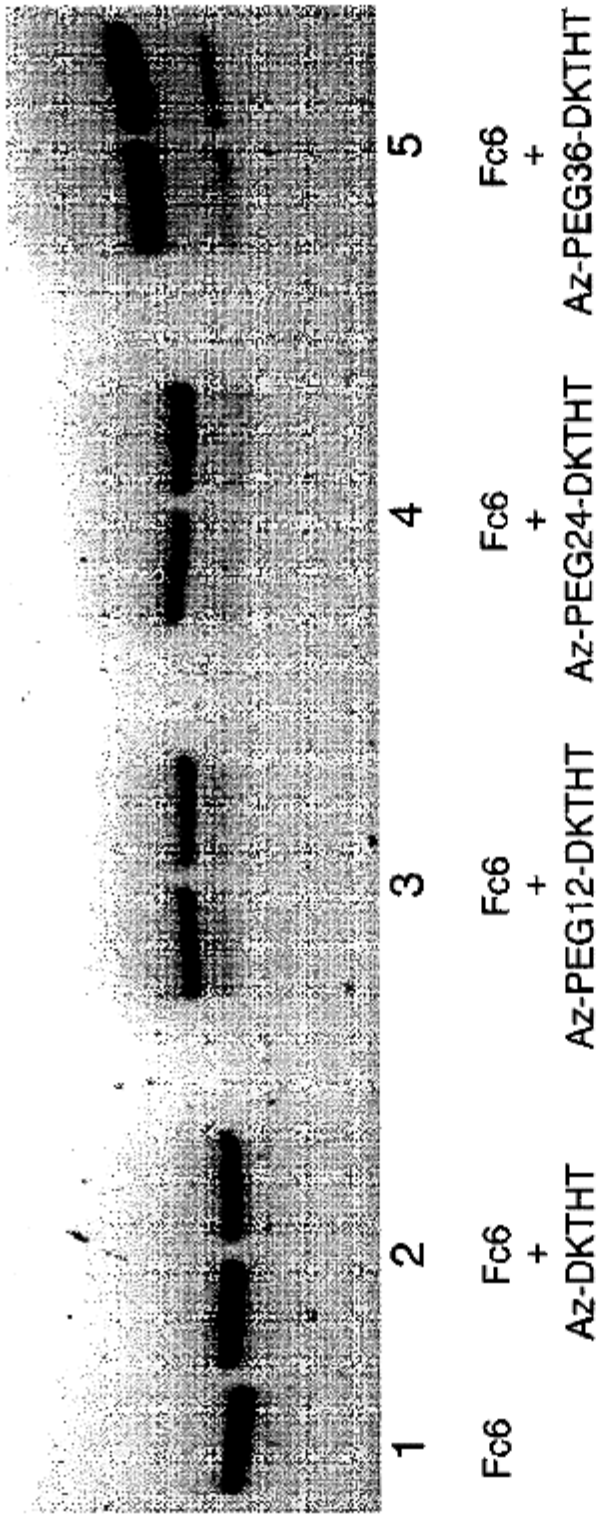

1
2
3
4
5
Fc6
Fc6 + Az-DKTHT
Fc6 + Az-PEG12-DKTHT
Fc6 + Az-PEG24-DKTHT
Fc6 + Az-PEG36-DKTHT
Az-PEGx-DKTHT-Fc6

Figura17

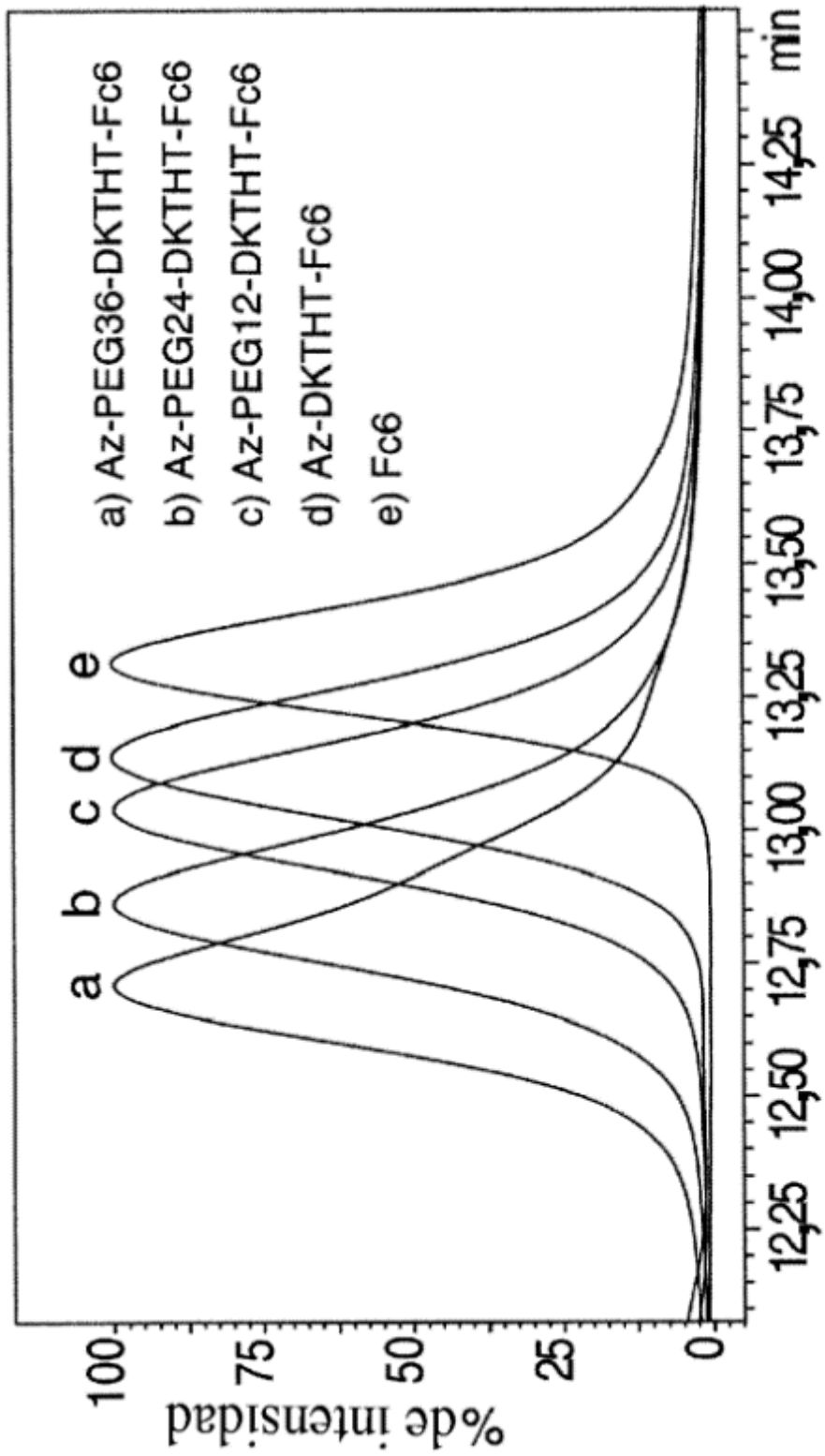

a) Az-PEG36-DKTHT-Fc6
b) Az-PEG24-DKTHT-Fc6
c) Az-PEG12-DKTHT-Fc6
d) Az-DKTHT-Fc6
e) Fc6
a b c d e
%de intensidad
100
75
50
25
0
12,25 12,50 12,75 13,00 13,25 13,50 13,75 14,00 14,25 min
tiempo de retención

Figura 18

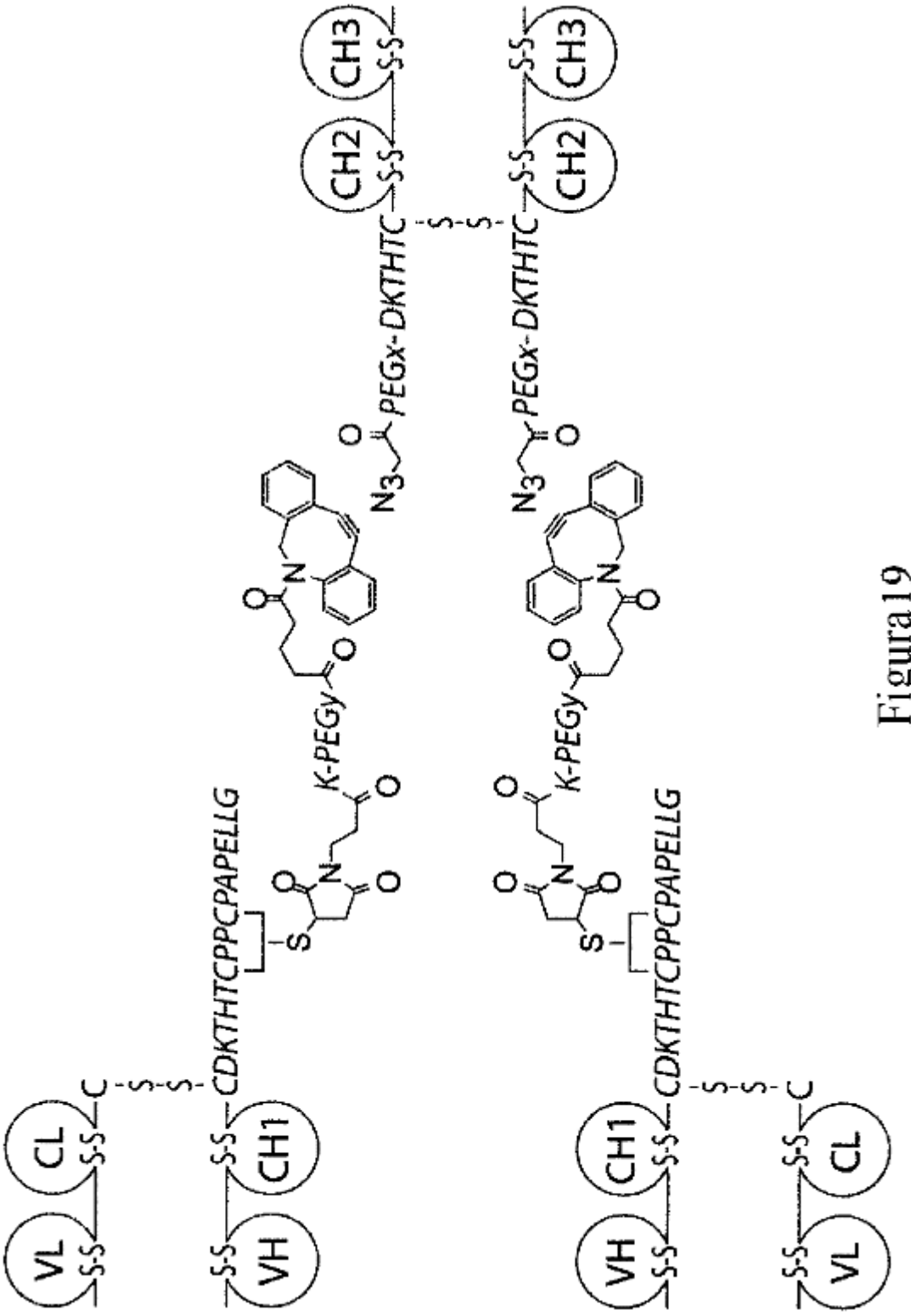

VL
CL
C
CDKTHTCPPCPAPELLG
VH
CH1
K-PEGy
N3
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3

Figura 19

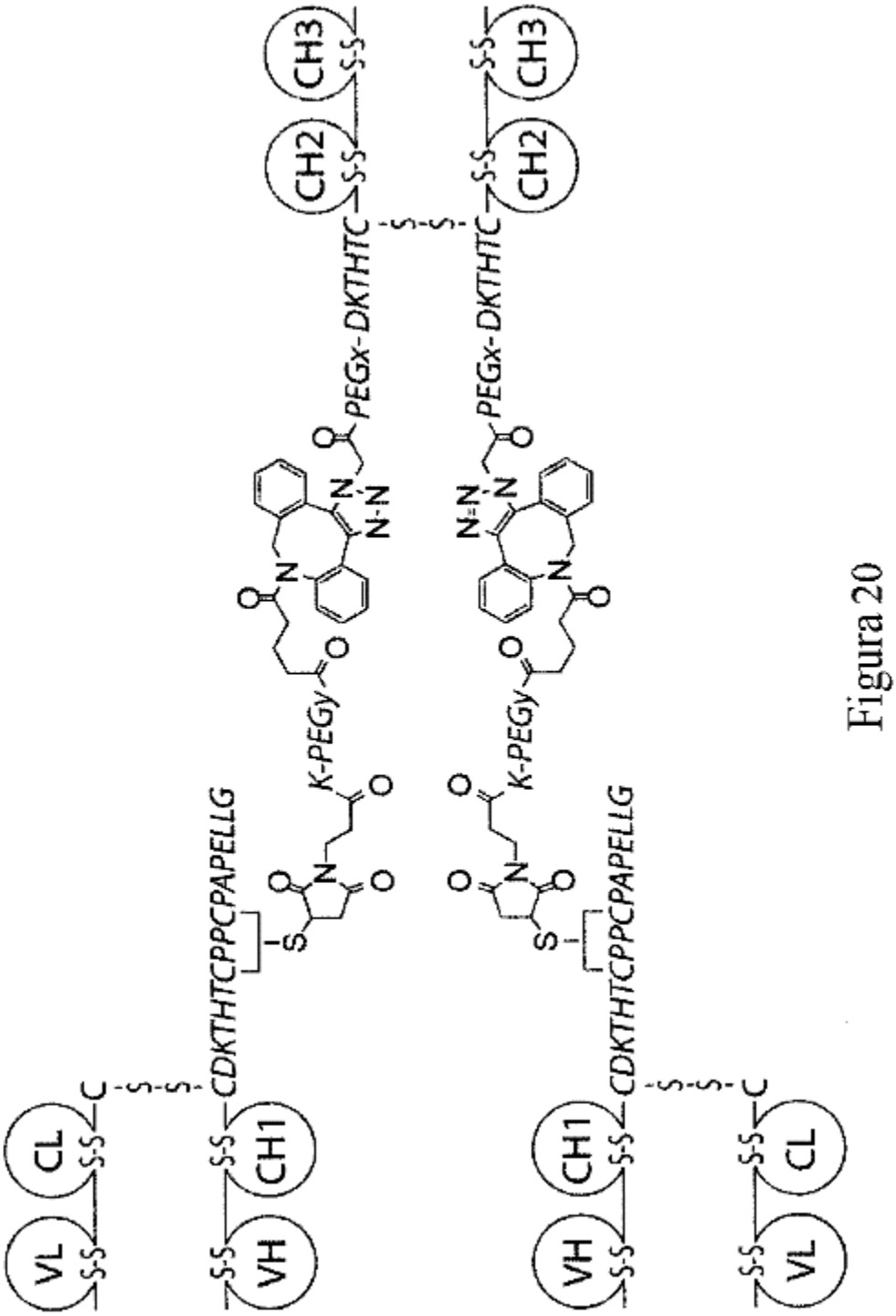
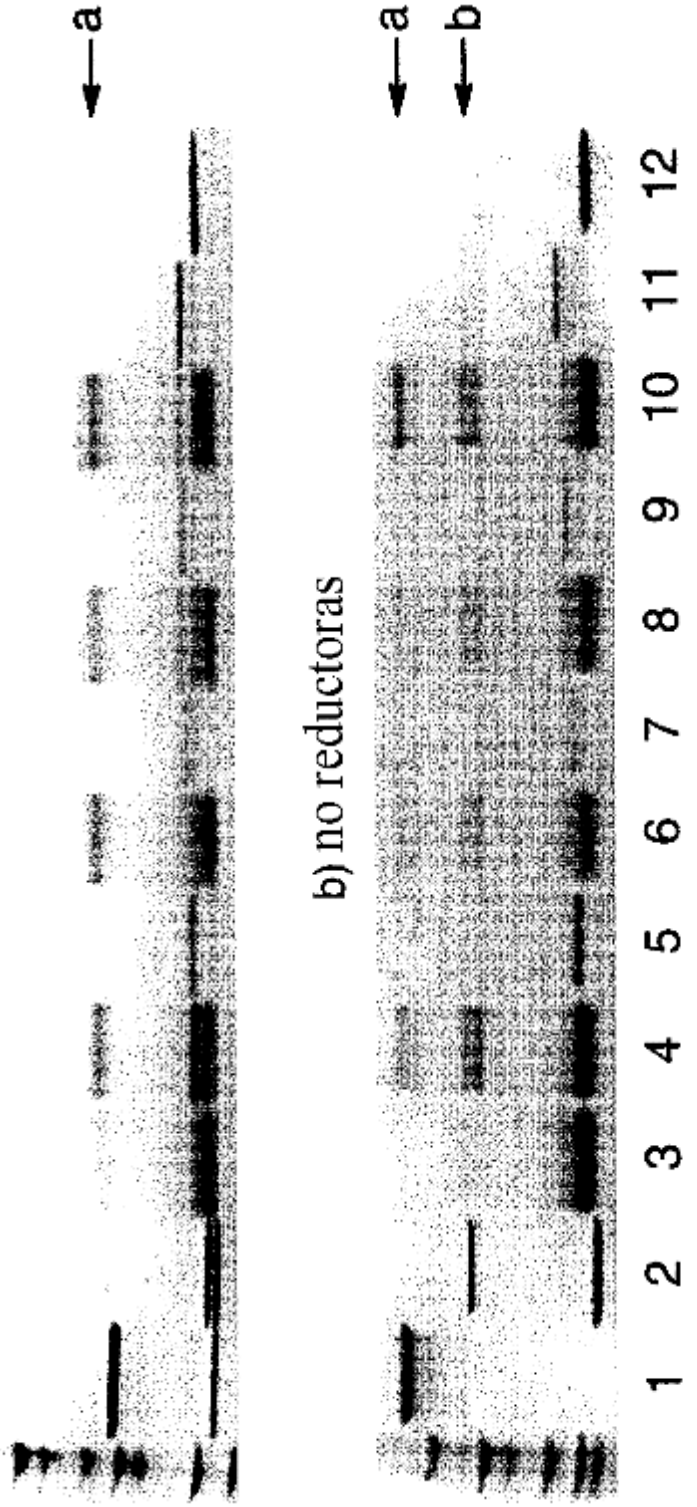
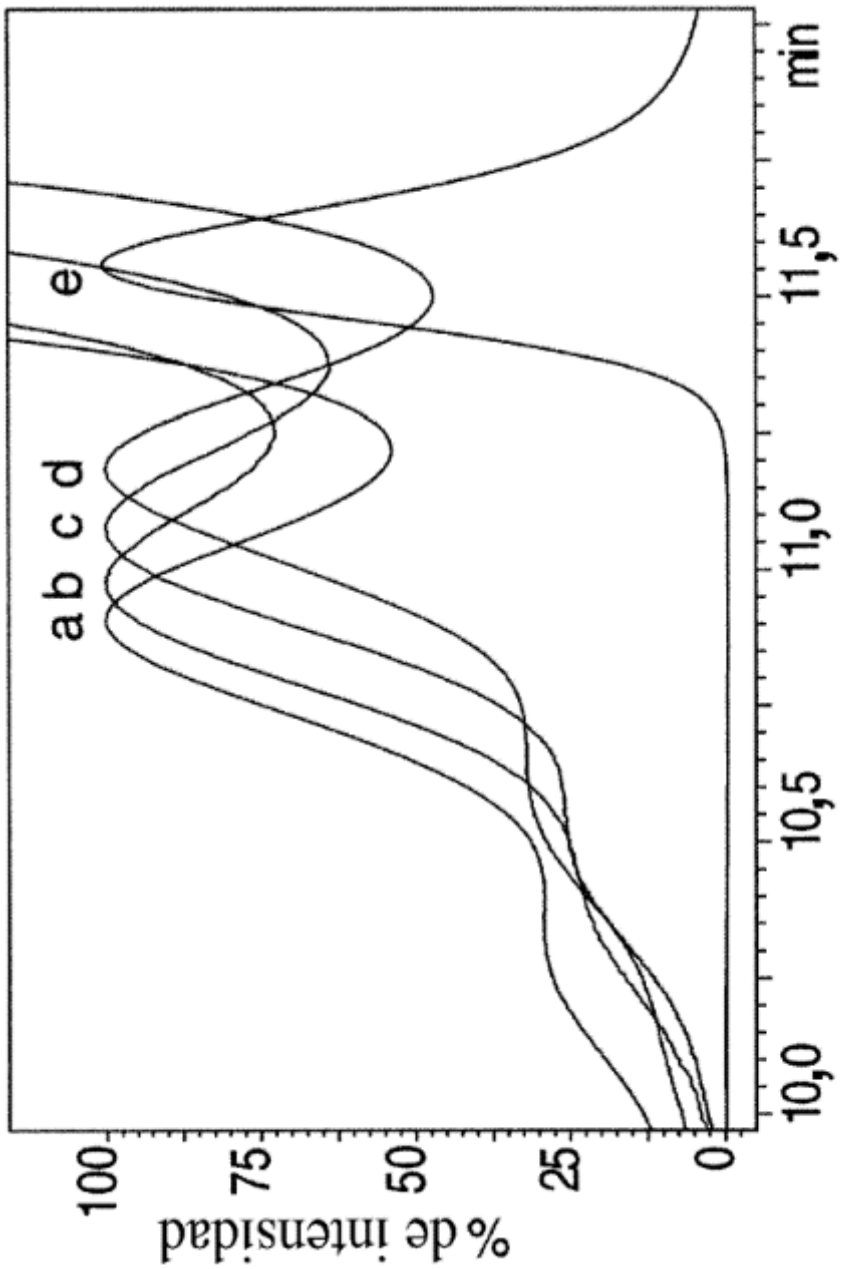


Figura 20



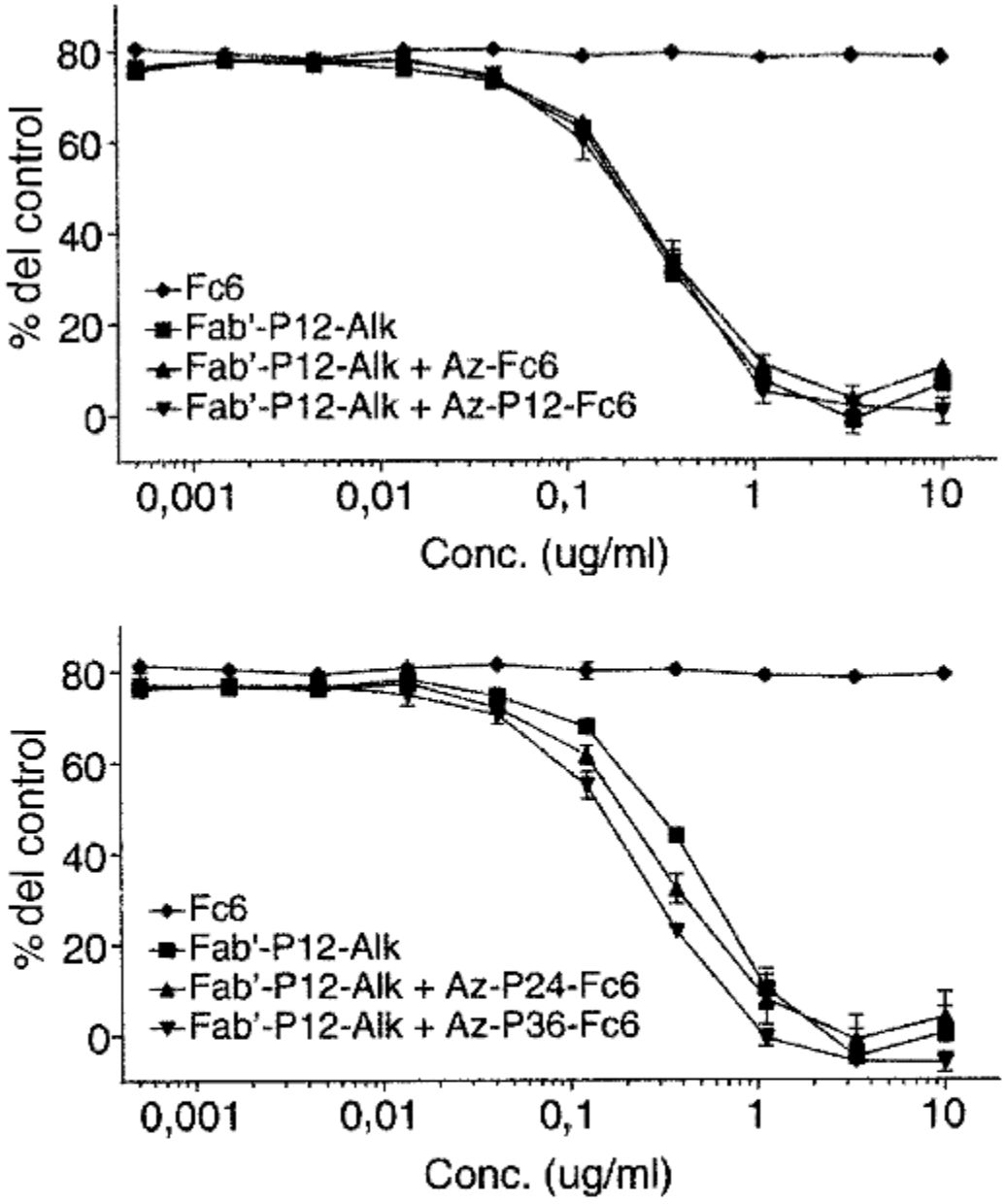
Adalimumab-Fab'-PEGy-Alk + Az-PEGx-DKTHT-Fc6

Figura 21



Fab'-PEGy-Alk-Az-PEGx-DKTHT-Fc6

Figura 22



Fab'-PEGy-Alk + Az-PEGx-DKTHT-Fc6

Figura 23

Fc6 + N3-Px-DKTHT-tiofenol ---> N3-Px-Fc (I)
a b c d e f
a b c d e f
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
N3-Px-Fc (I)
reductoras
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
N3-Px-Fc (I)
no reductoras

Figura 24

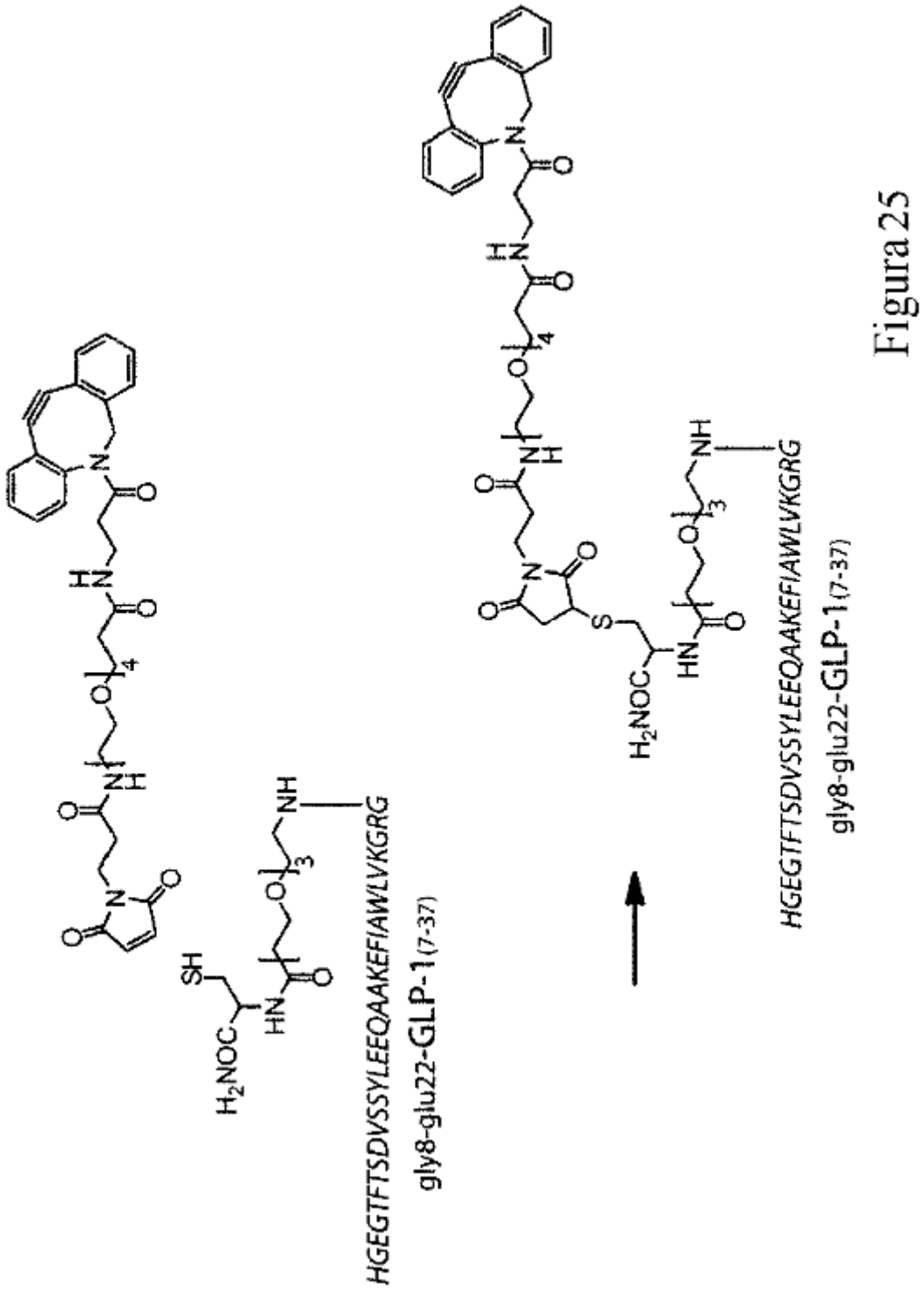

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
gly8-glu22-GLP-1(7-37)

Figura 25

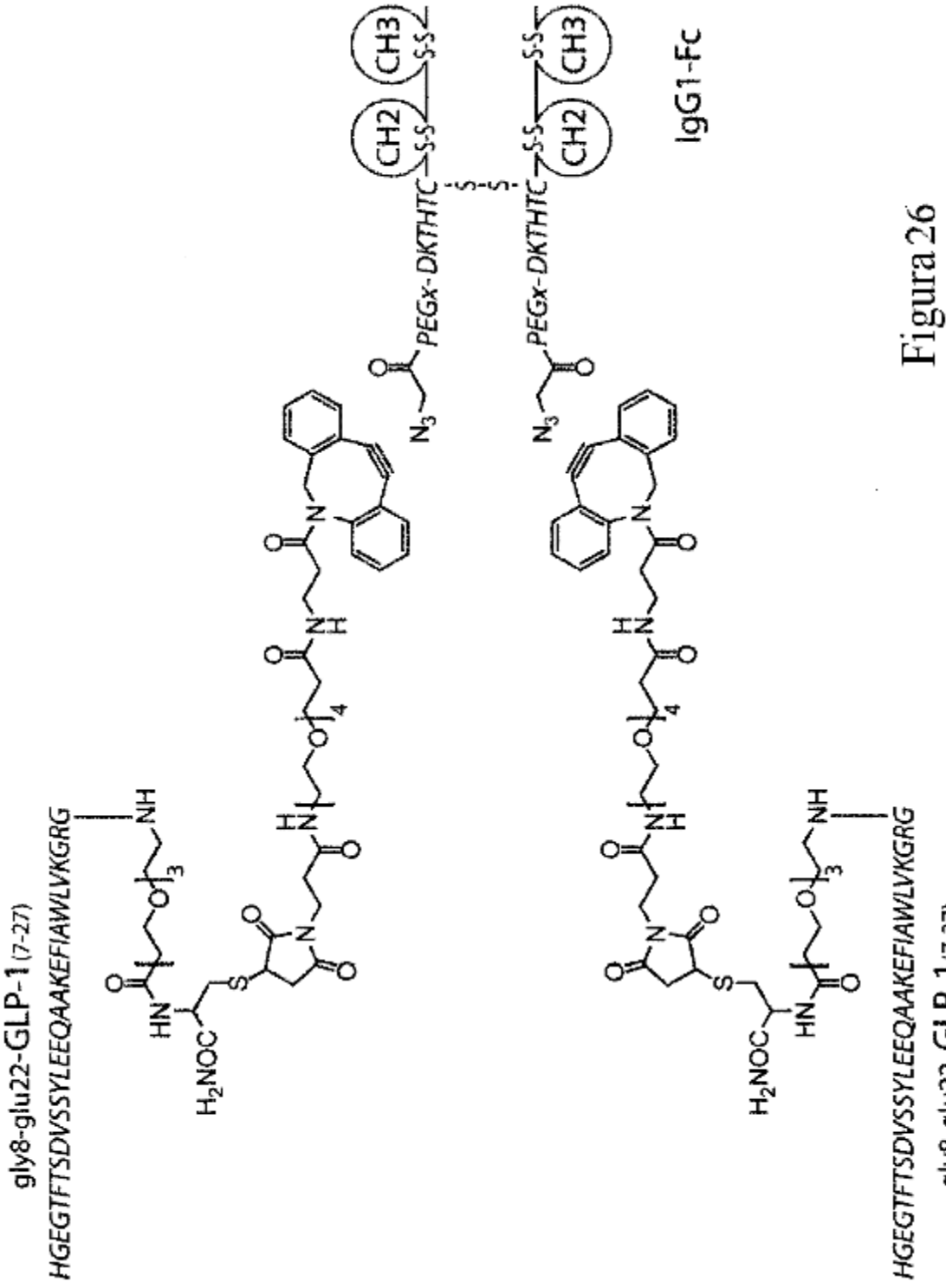

gly8-glu22-GLP-1(7-27)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
PEGx-DKTHTC
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
CH2
CH3
IgG1-Fc

Figura 26

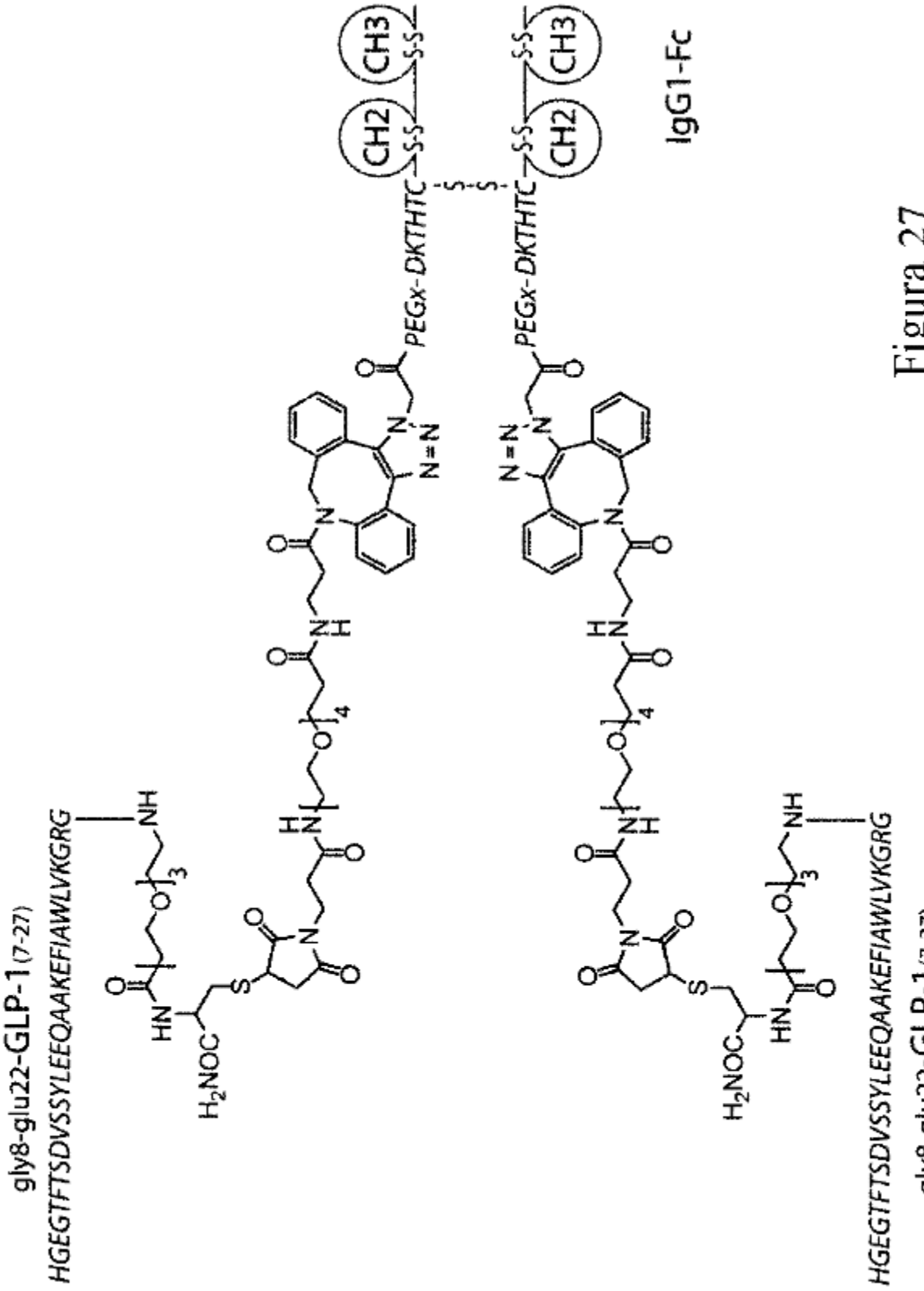

gly8-glu22-GLP-1(7-27)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
S-S
IgG1-Fc
gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG

Figura 27

N3-Px-Fc (I) + GLP1-P7-DIBAC --> GLP1-P7-DN-Px-Fc (II)
a b c d e f
a b c d e f
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
GLP1-P7-DN-Px-Fc (II)
reductoras
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
GLP1-P7-DN-Px-Fc (II)
no reductoras

Figura 28

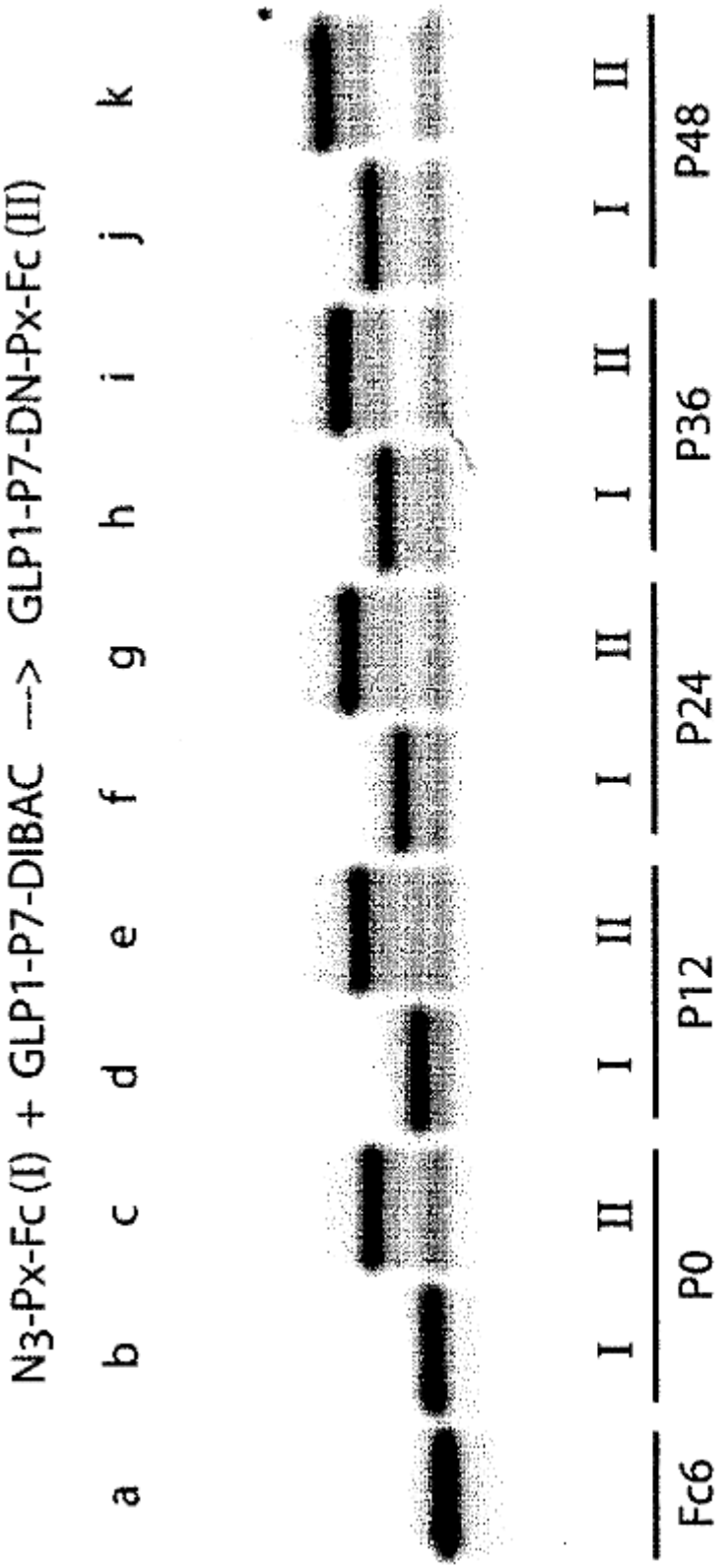

N3-Px-Fc (I) + GLP1-P7-DIBAC ---> GLP1-P7-DN-Px-Fc (II)
a b c d e f g h i j k
Fc6
I II P0
I II P12
I II P24
I II P36
I II P48

Figura 29

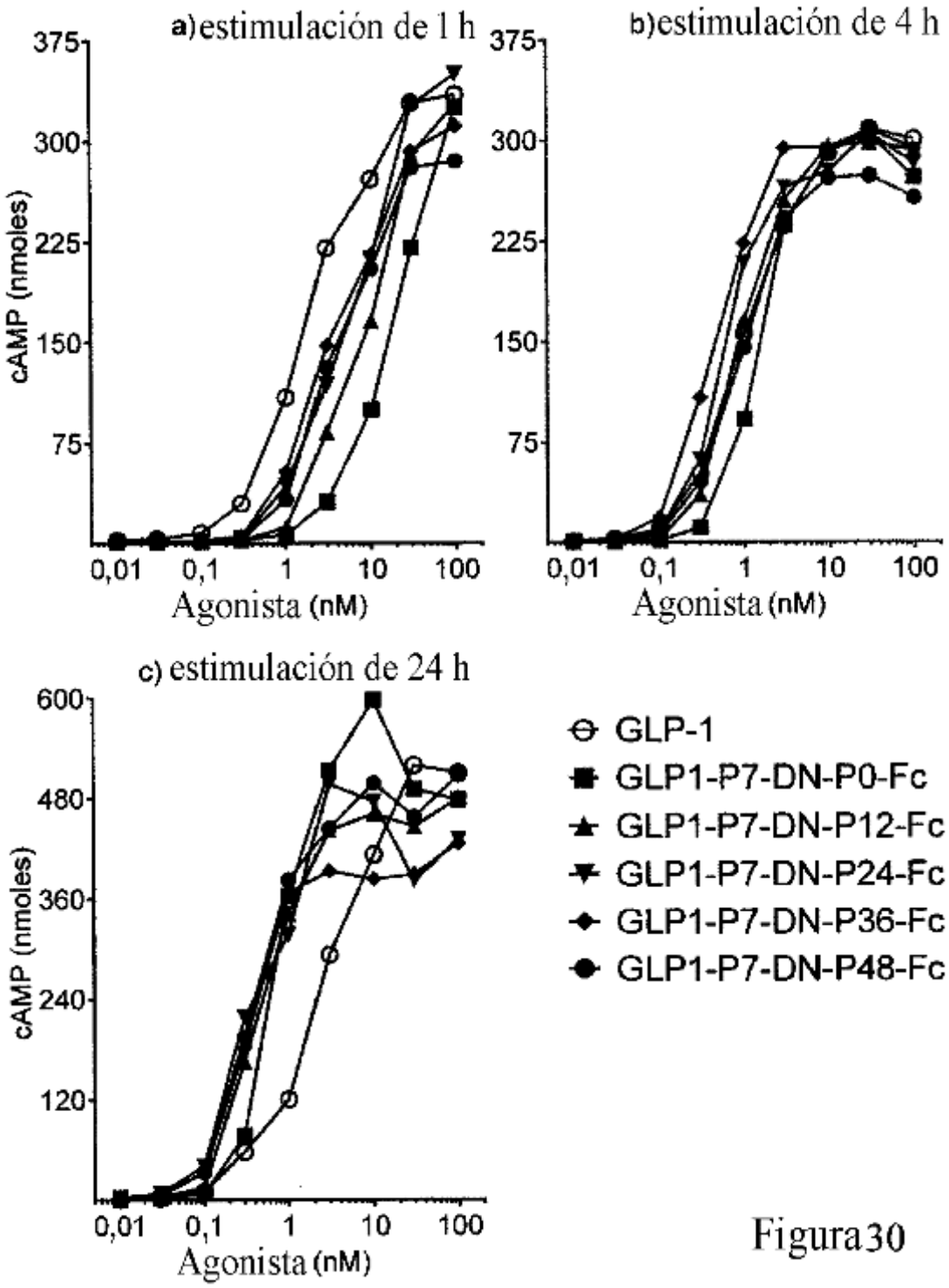

a) estimulación de 1 h
b) estimulación de 4 h
c) estimulación de 24 h
cAMP (nmoles)
Agonista (nM)
0,01
0,1
1
10
100
75
120
150
225
240
300
360
375
480
600
GLP-1
GLP1-P7-DN-P0-Fc
GLP1-P7-DN-P12-Fc
GLP1-P7-DN-P24-Fc
GLP1-P7-DN-P36-Fc
GLP1-P7-DN-P48-Fc

Figura 30

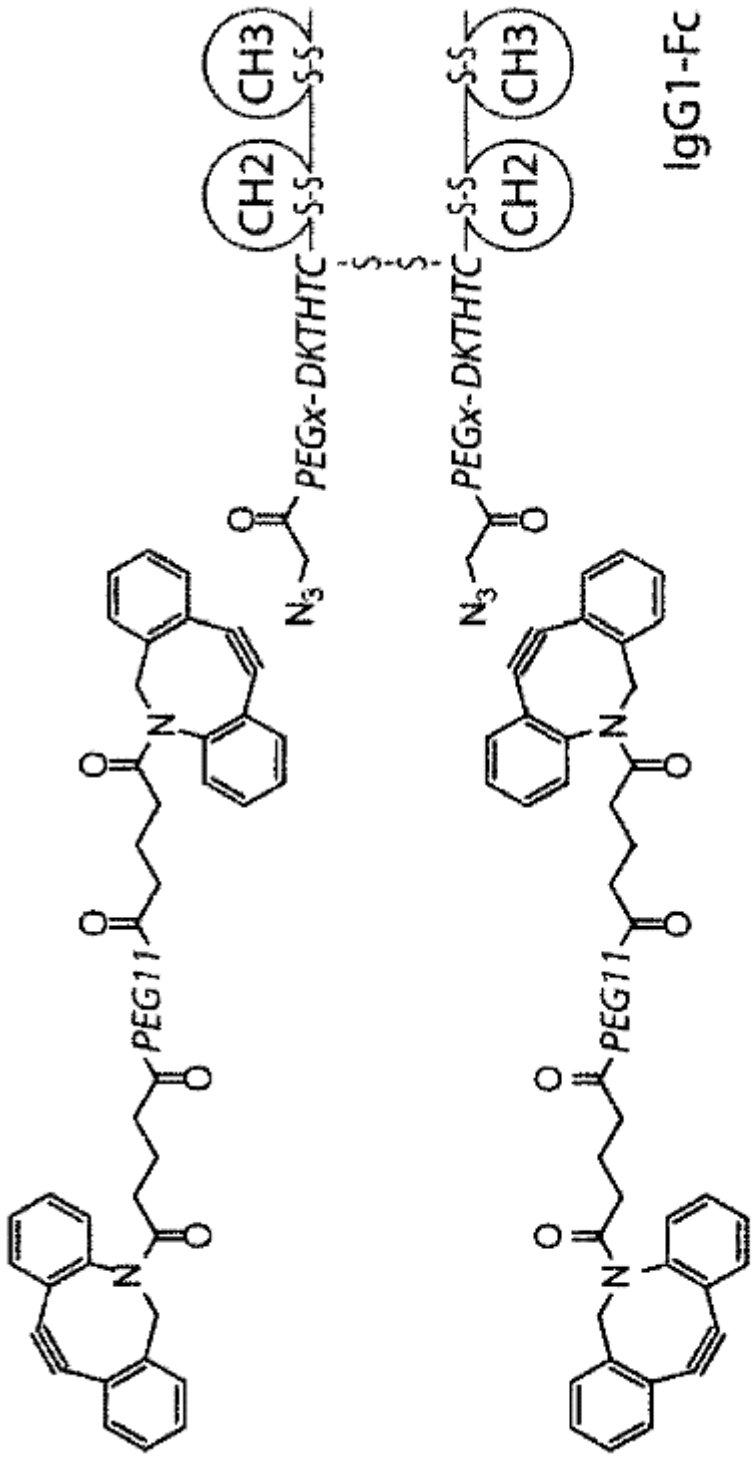


Figura 31

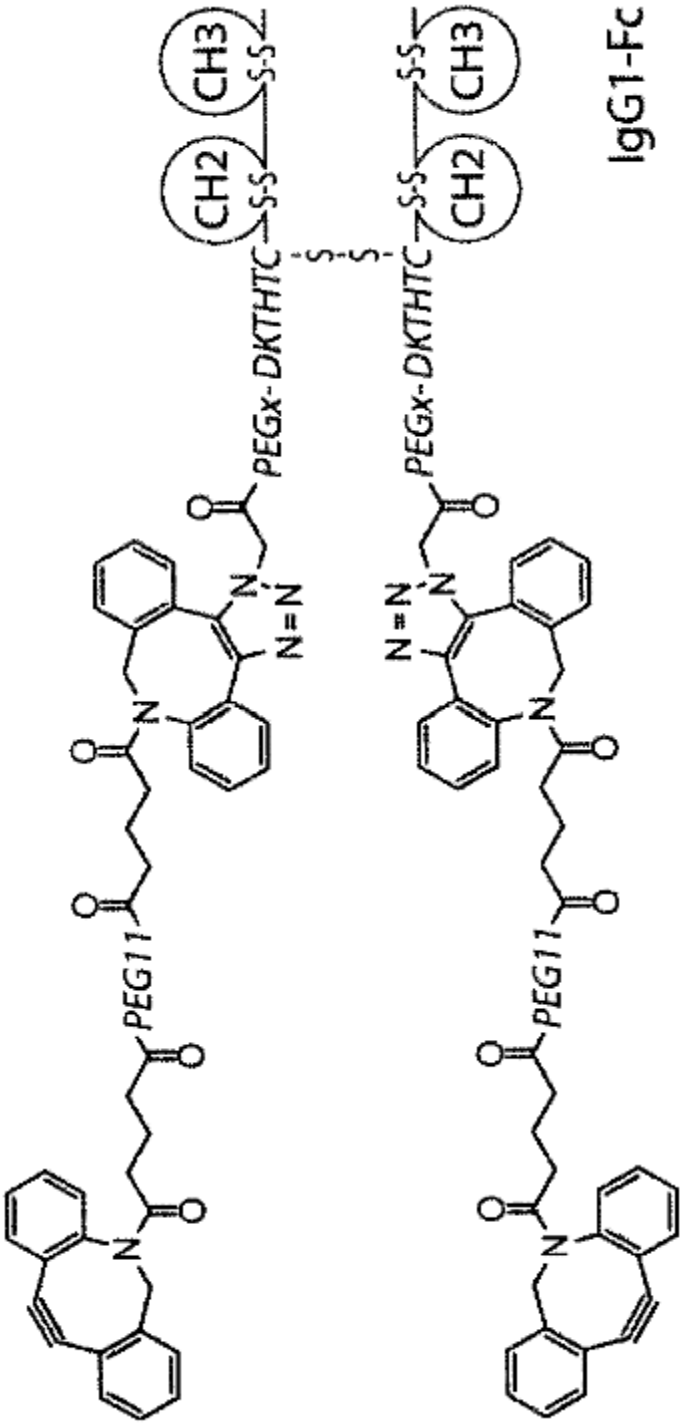


Figura 32

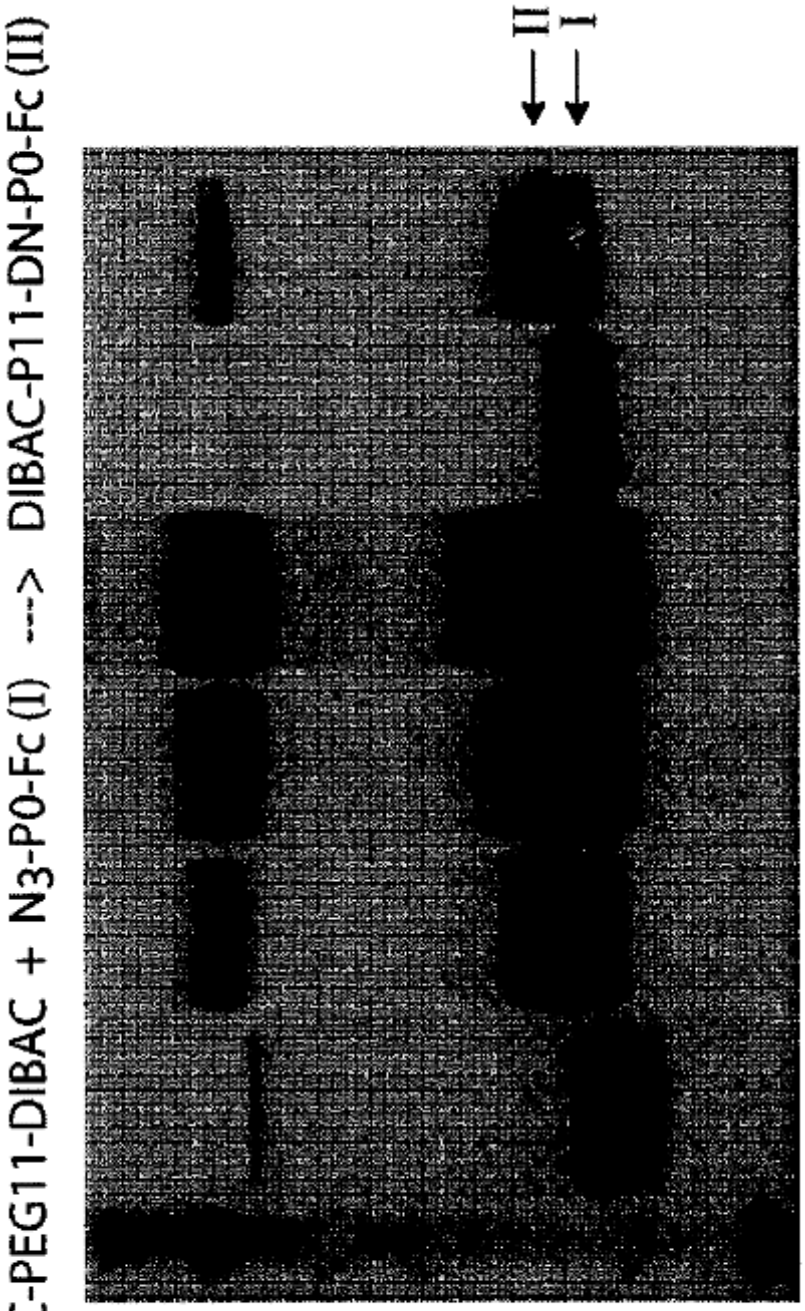


Figura 33

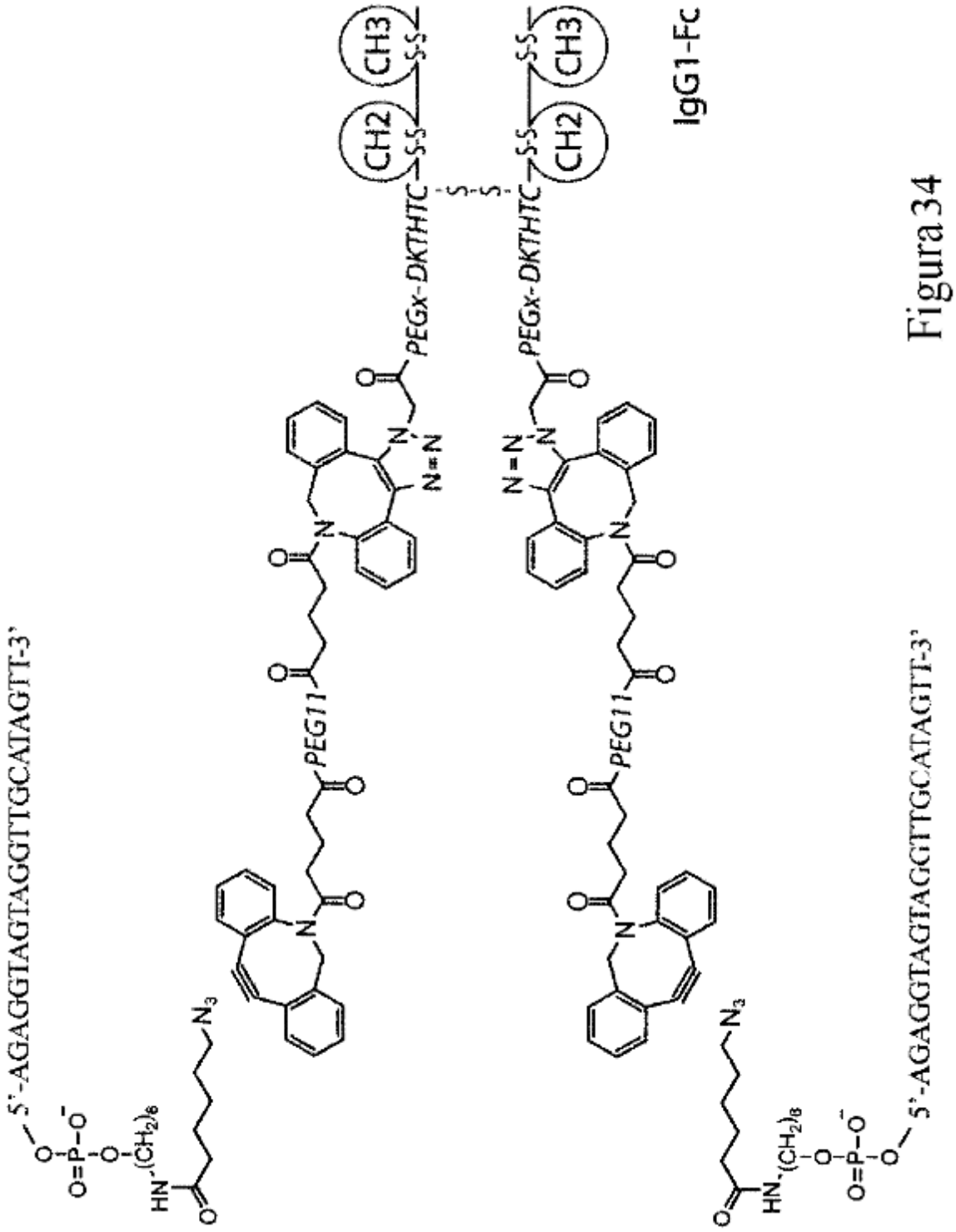

5'-AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT-3'
PEG11
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
S-S
IgG1-Fc

Figura 34

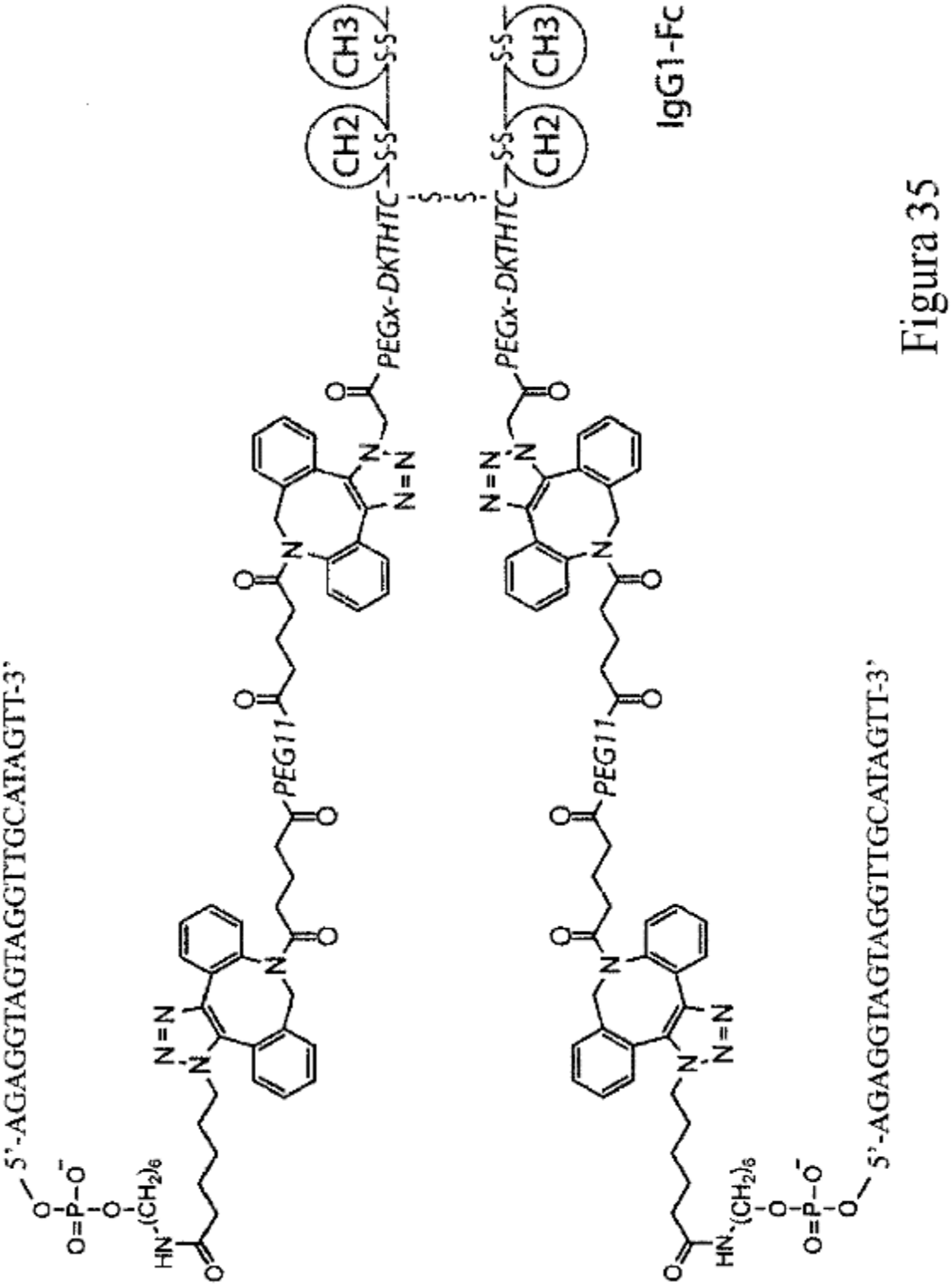

5'-AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT-3'
PEG11
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
IgG1-Fc

Figura 35

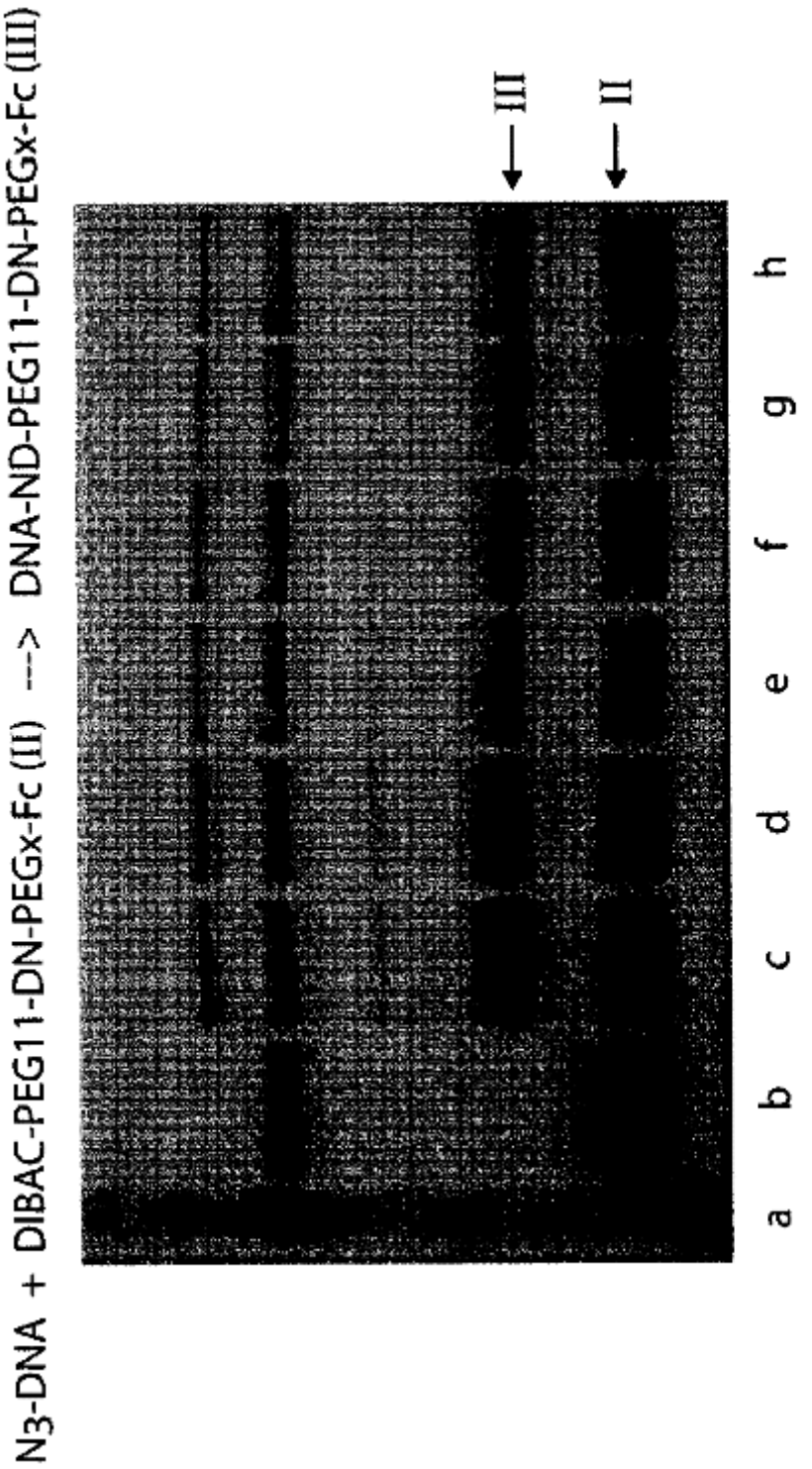

N3-DNA + DIBAC-PEG11-DN-PEGx-Fc (II) --> DNA-ND-PEG11-DN-PEGx-Fc (III)
III
II
a
b
c
d
e
f
g
h

Figura 36

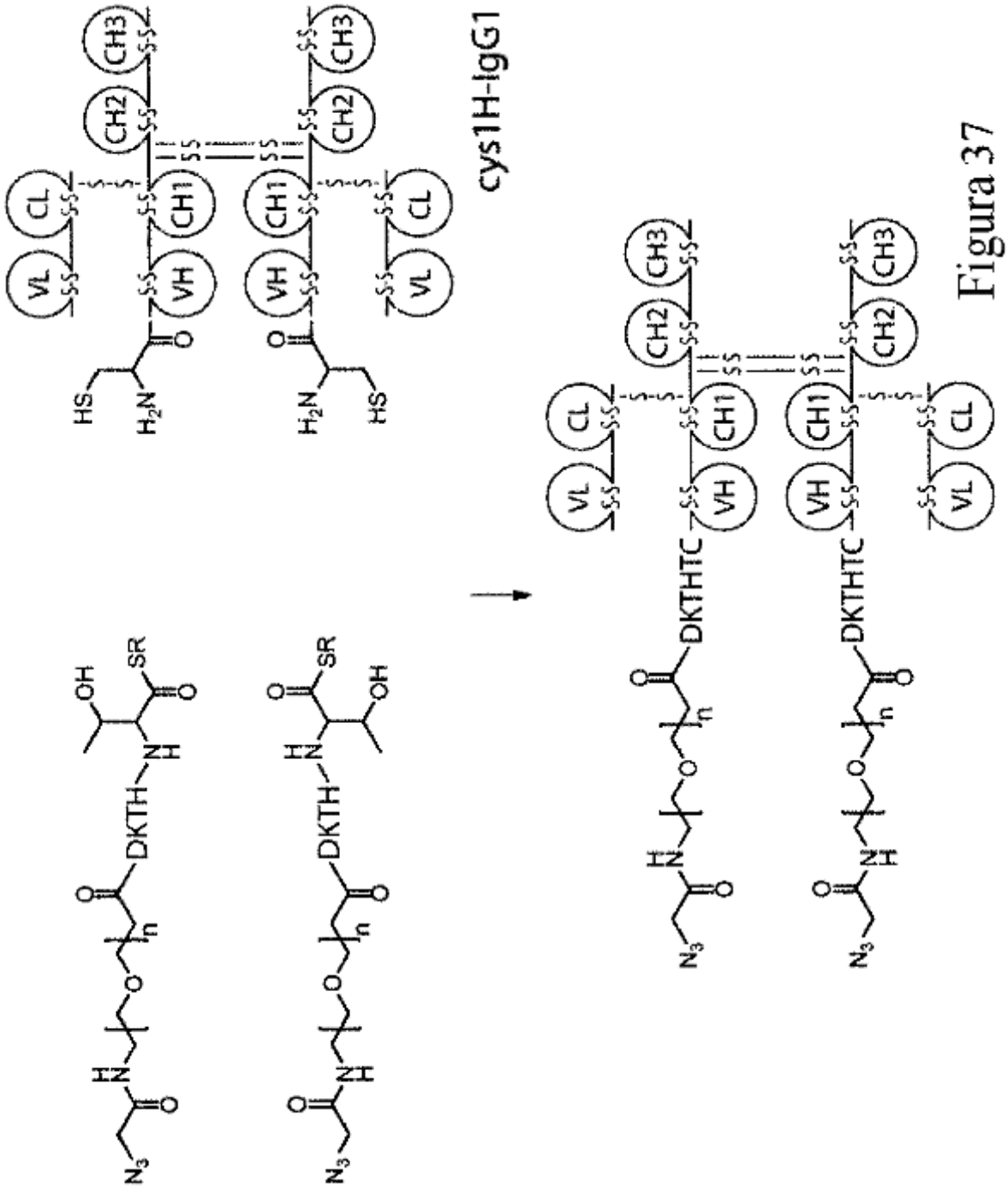
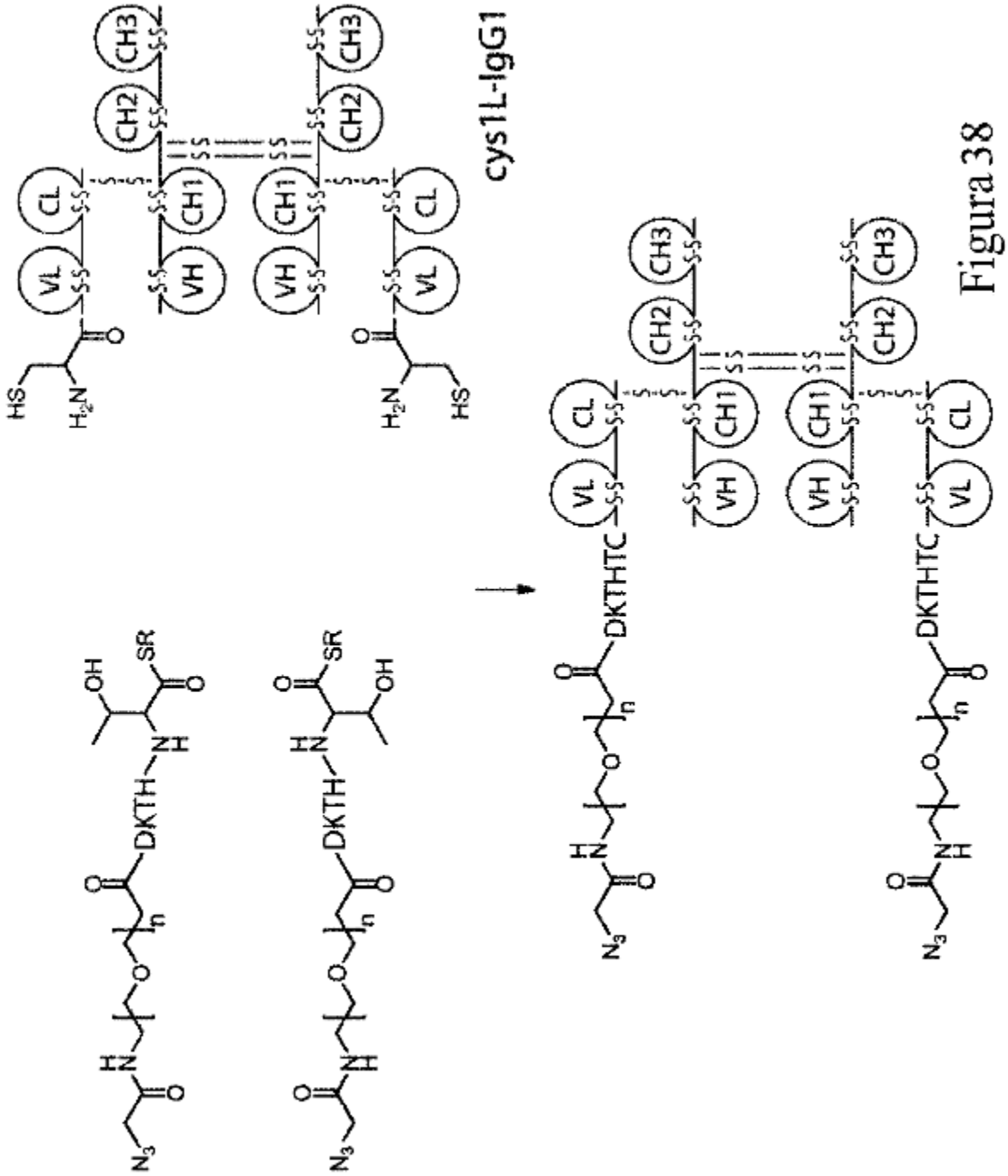


Figura 37


cys1L-IgG1
DKTHTC
DKTH
VL
CL
VH
CH1
CH2
CH3
HS
SR
OH
Figura 38

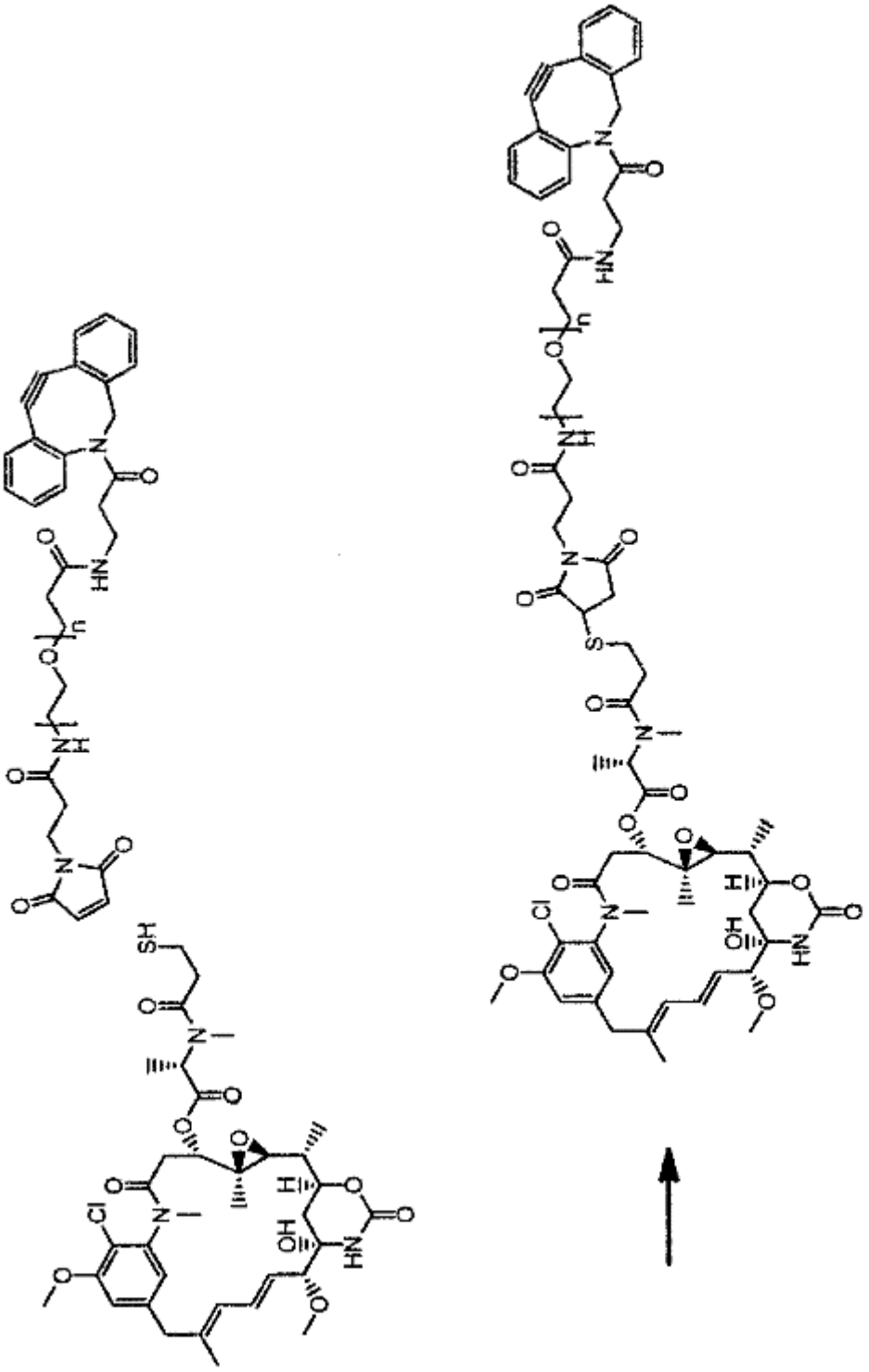


Figura 39

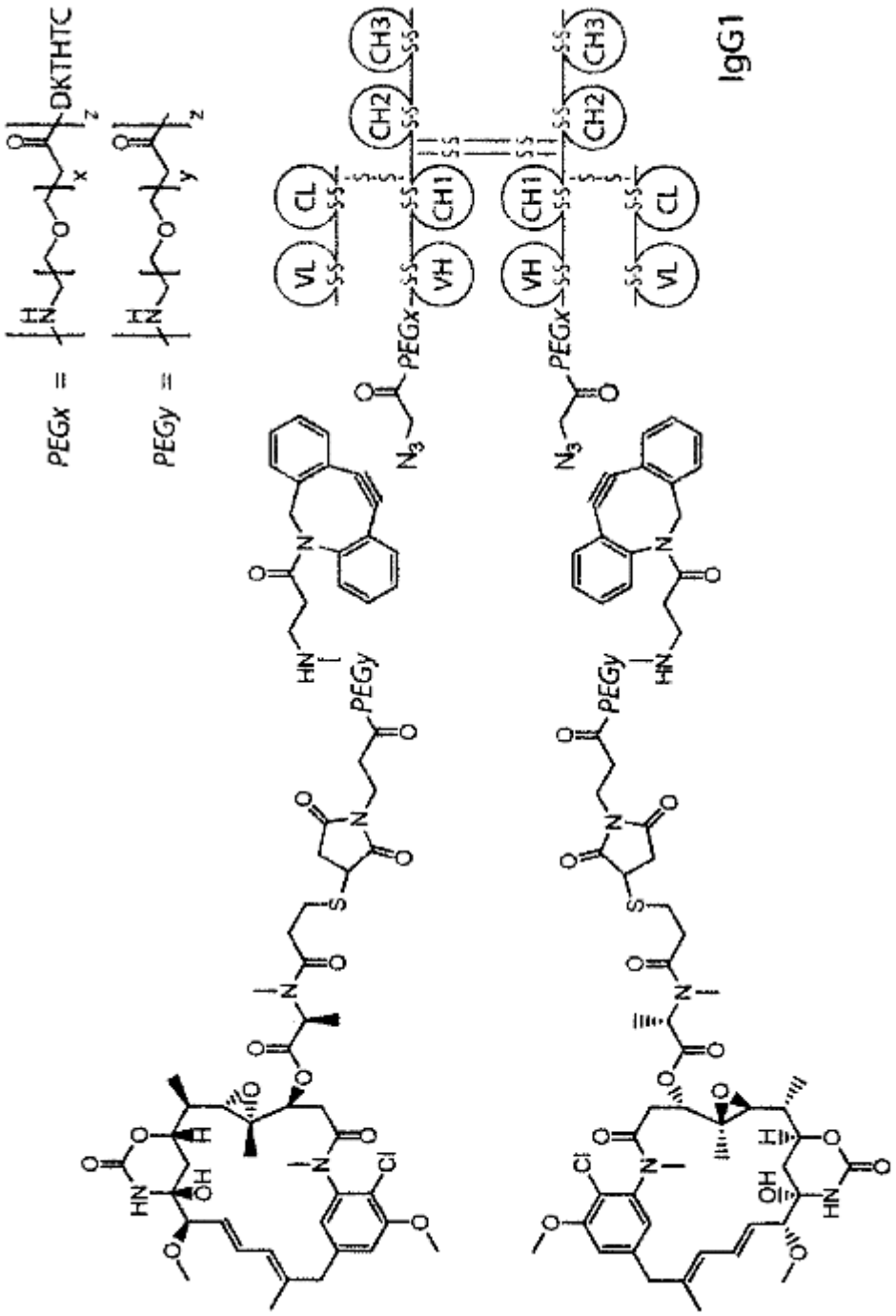


Figura 40

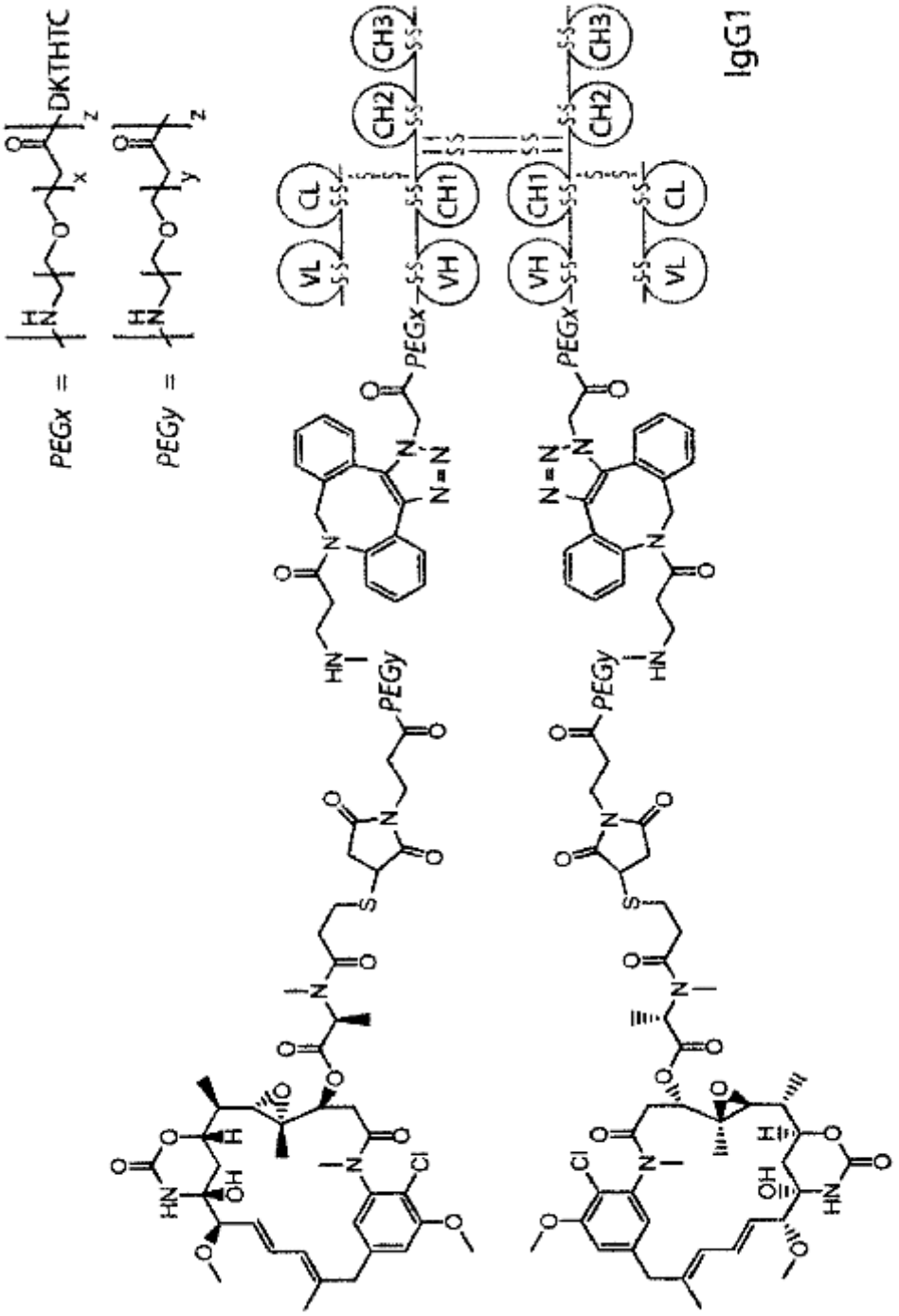


Figura 41

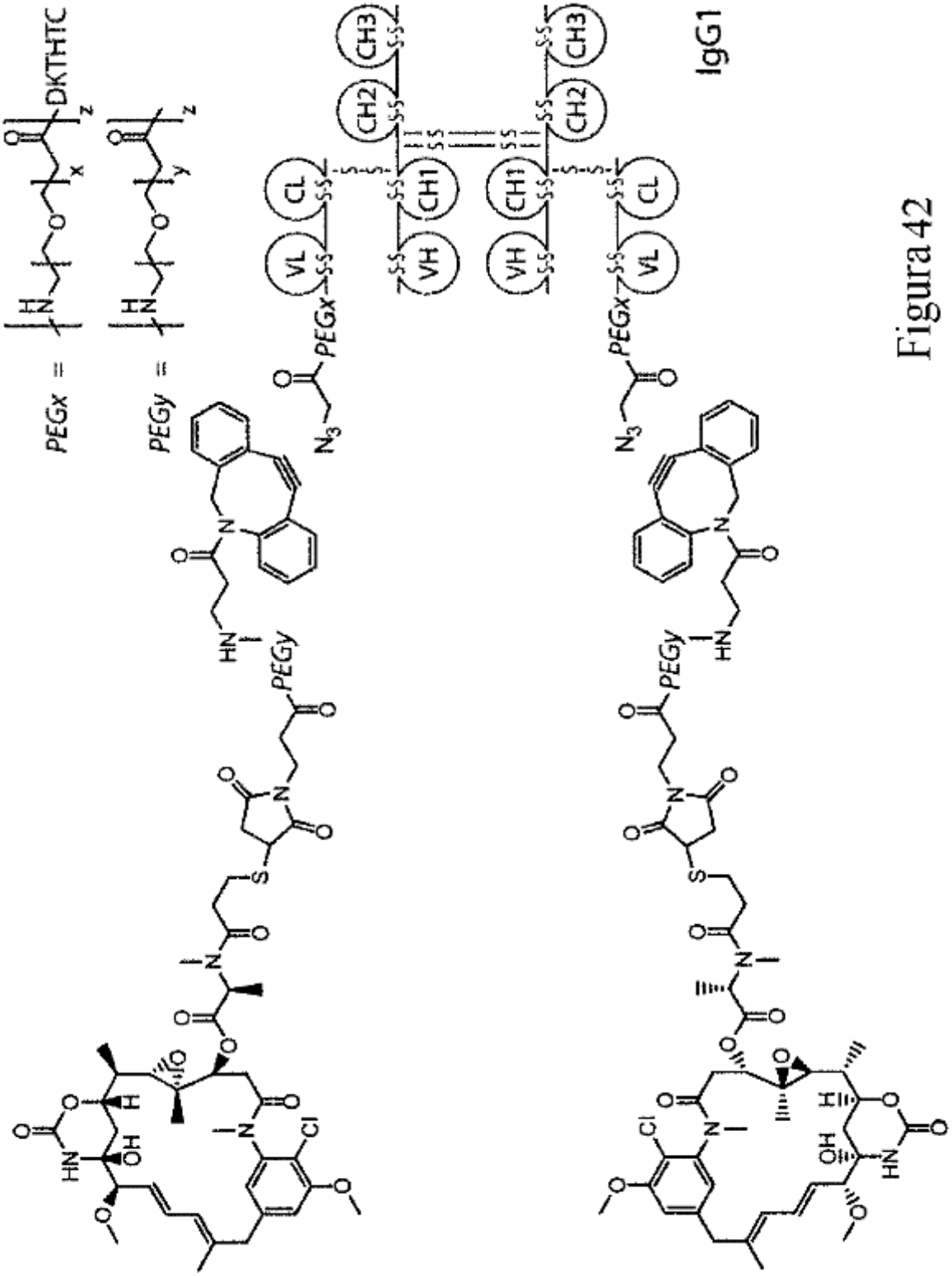


Figura 42

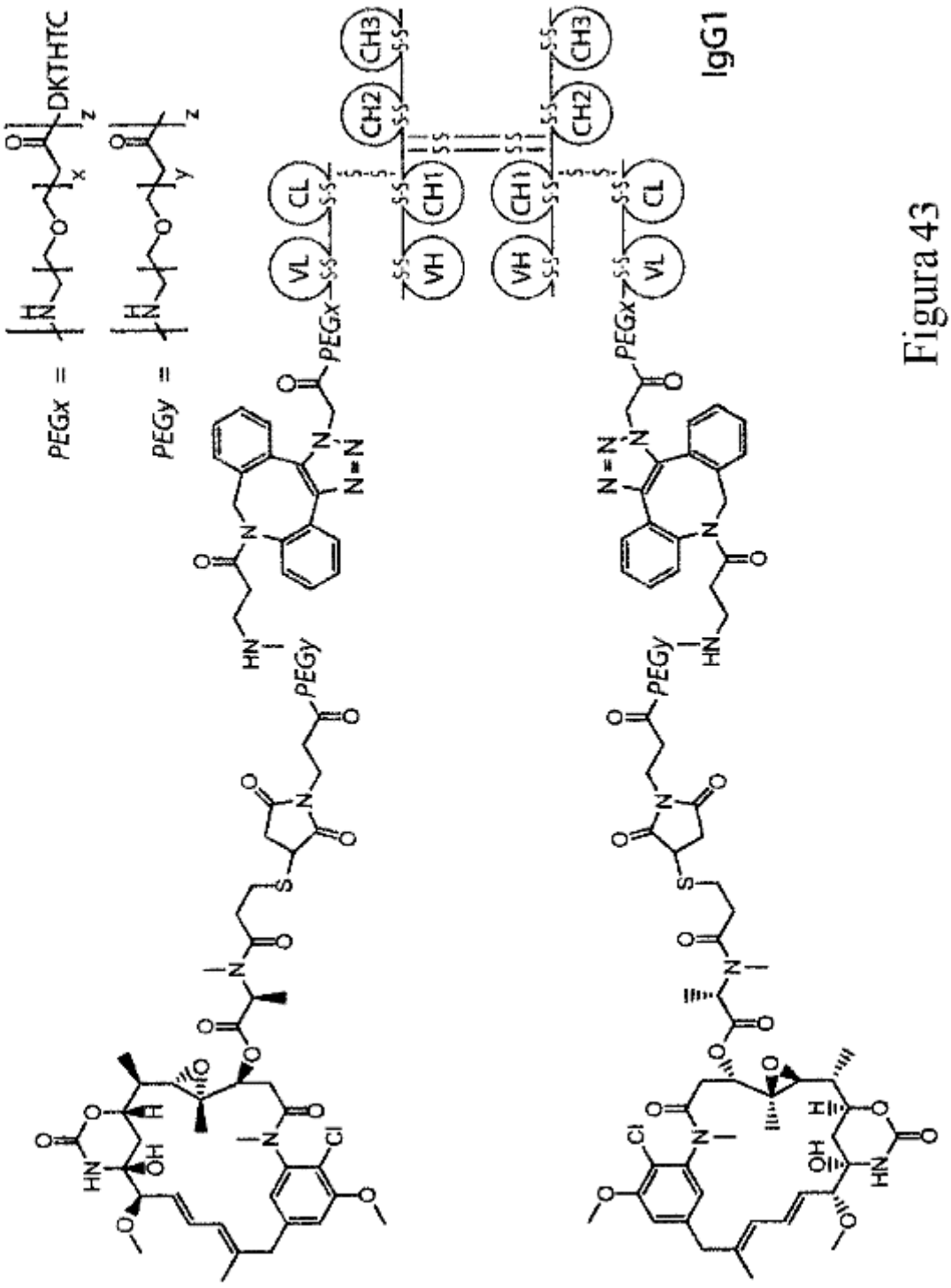


Figura 43

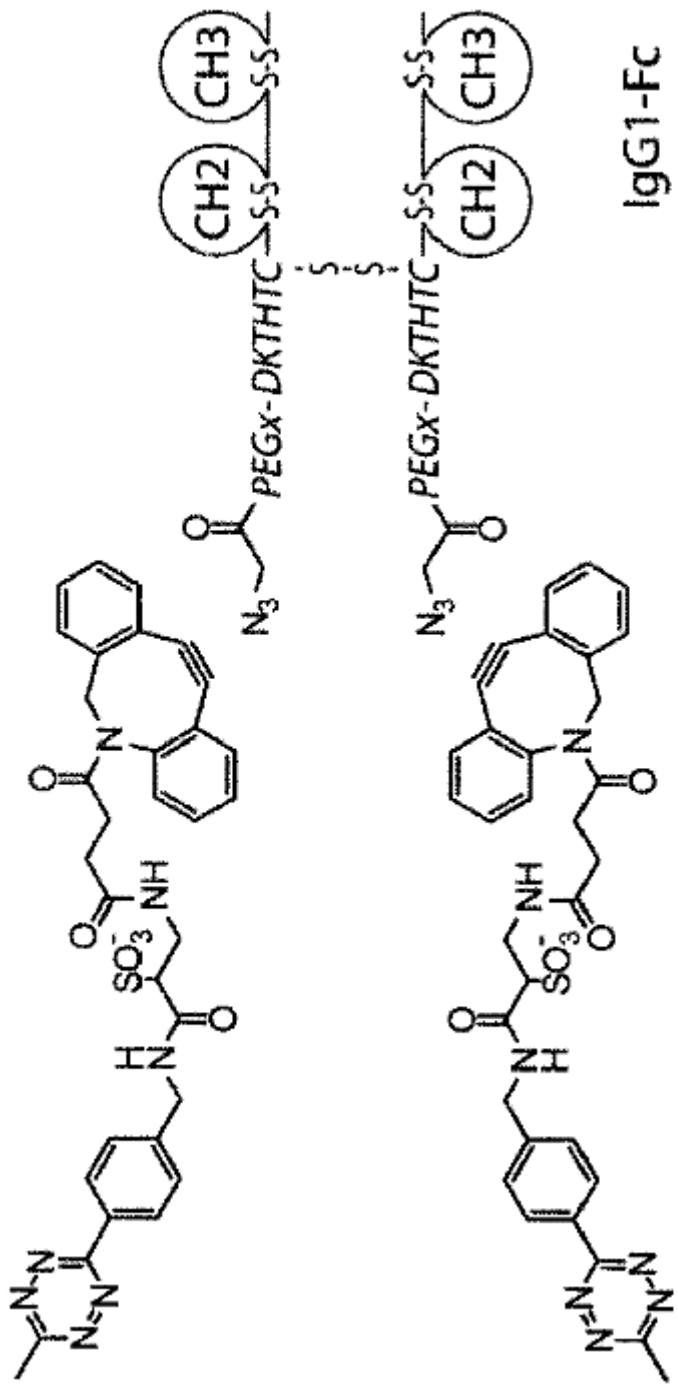


Figura 44

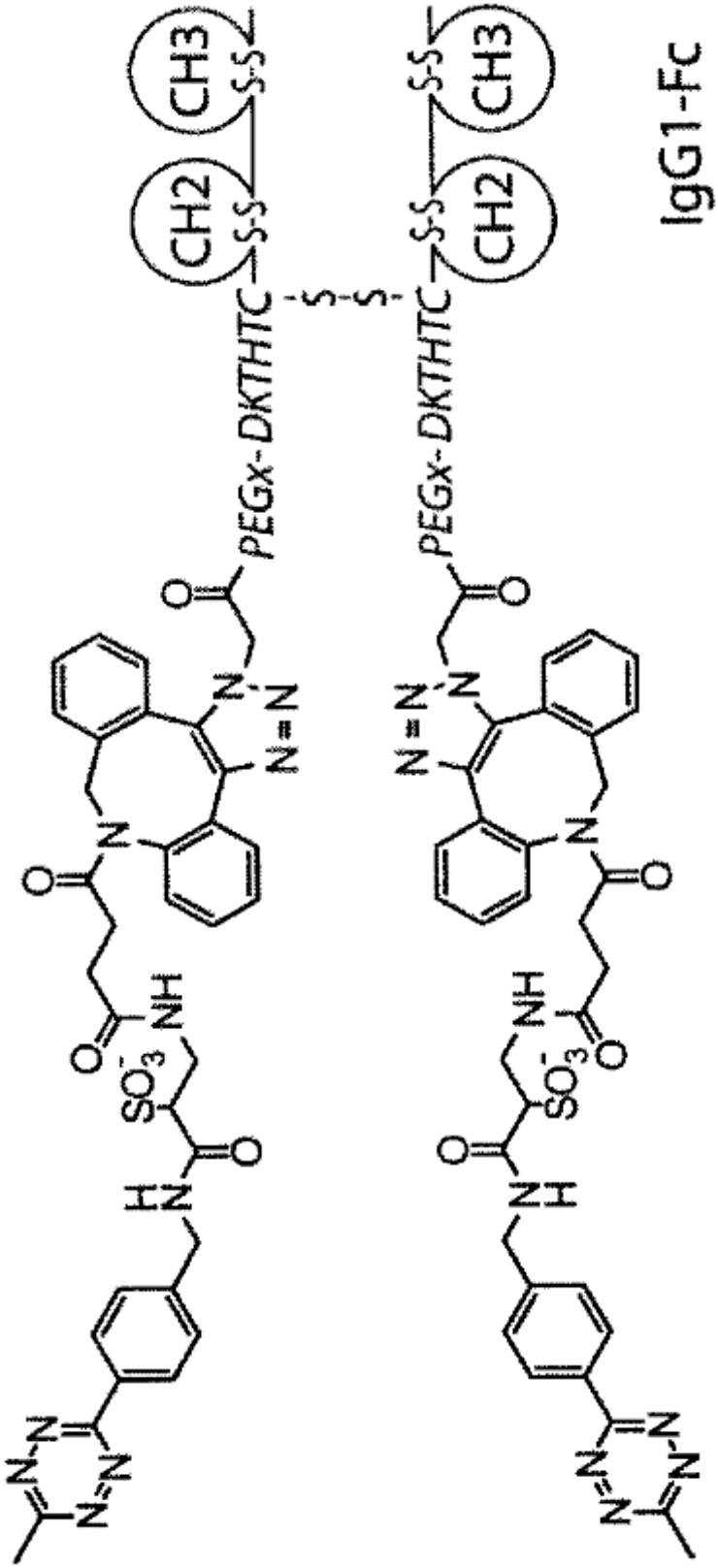


Figura 45

Tet-DIBAC + N3-Px-Fc --> Tet-Px-Fc
a b c d e f
a b c d e f
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
Tet-Px-Fc
reductoras
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
Tet-Px-Fc
no reductoras

Figura 46

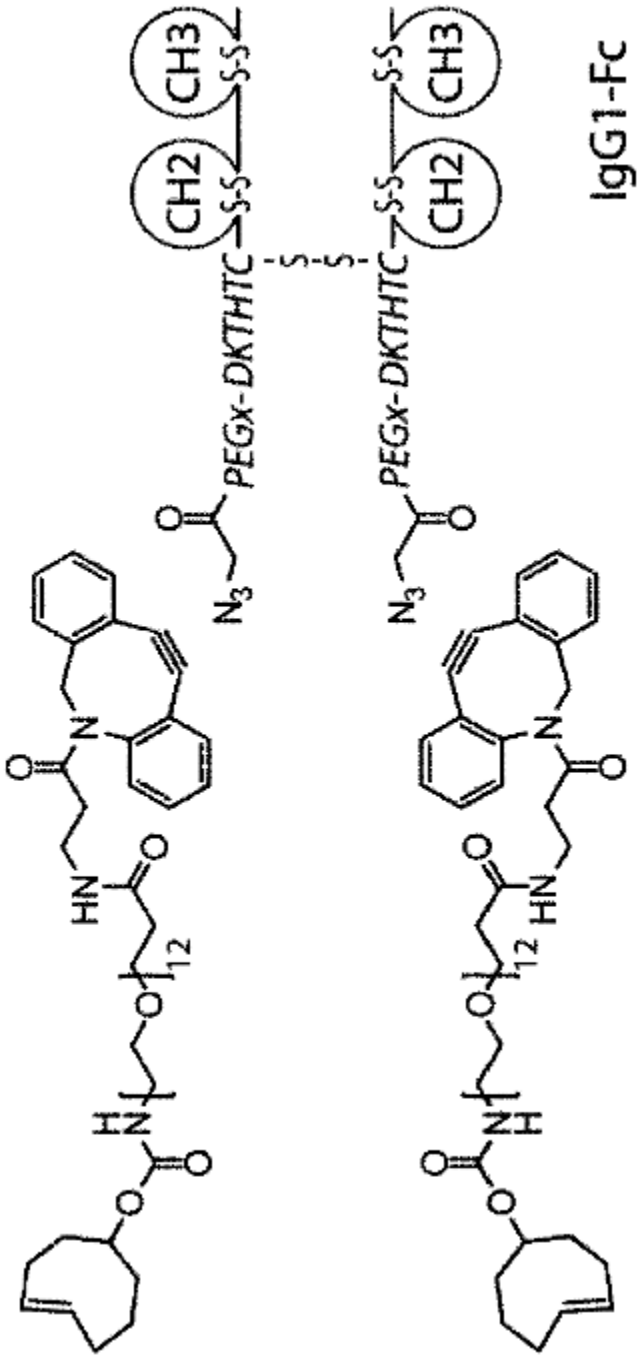


Figura 47

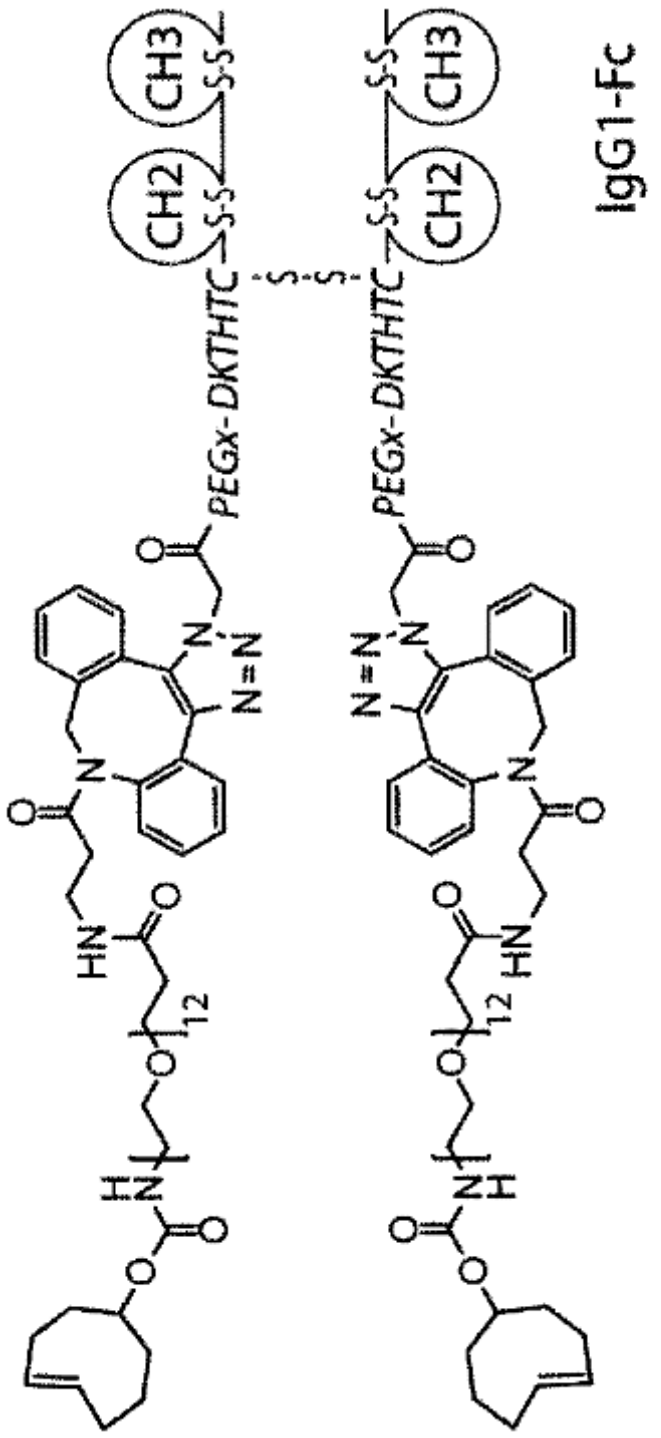


Figura 48

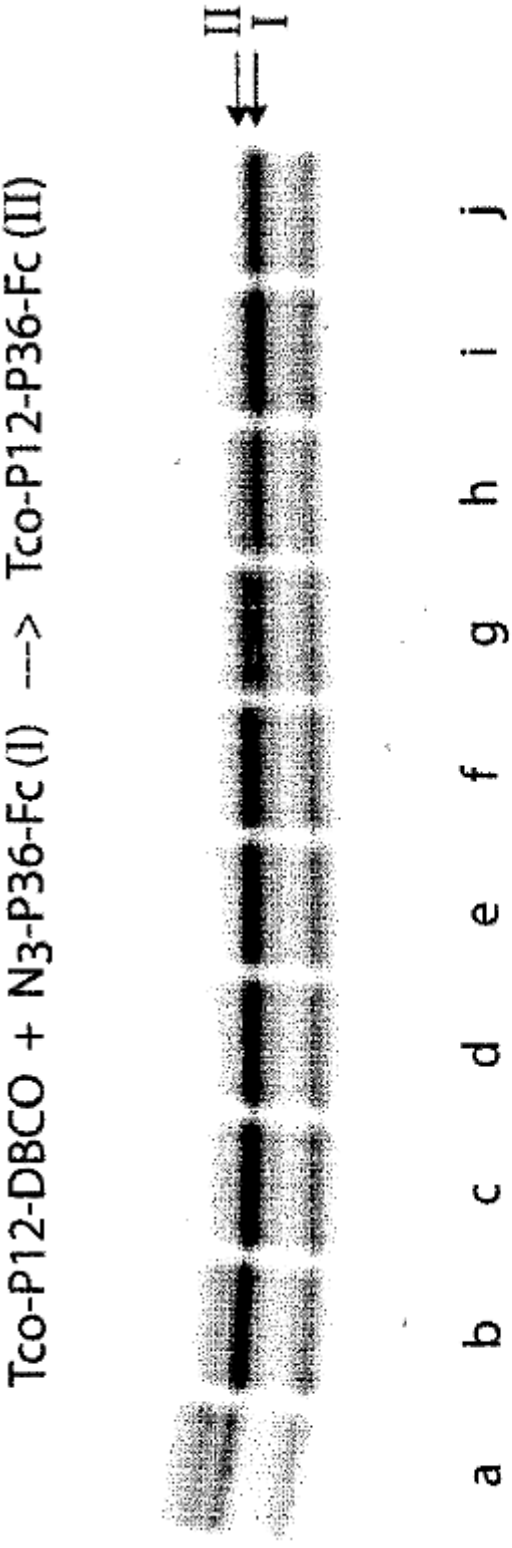


Figura 49

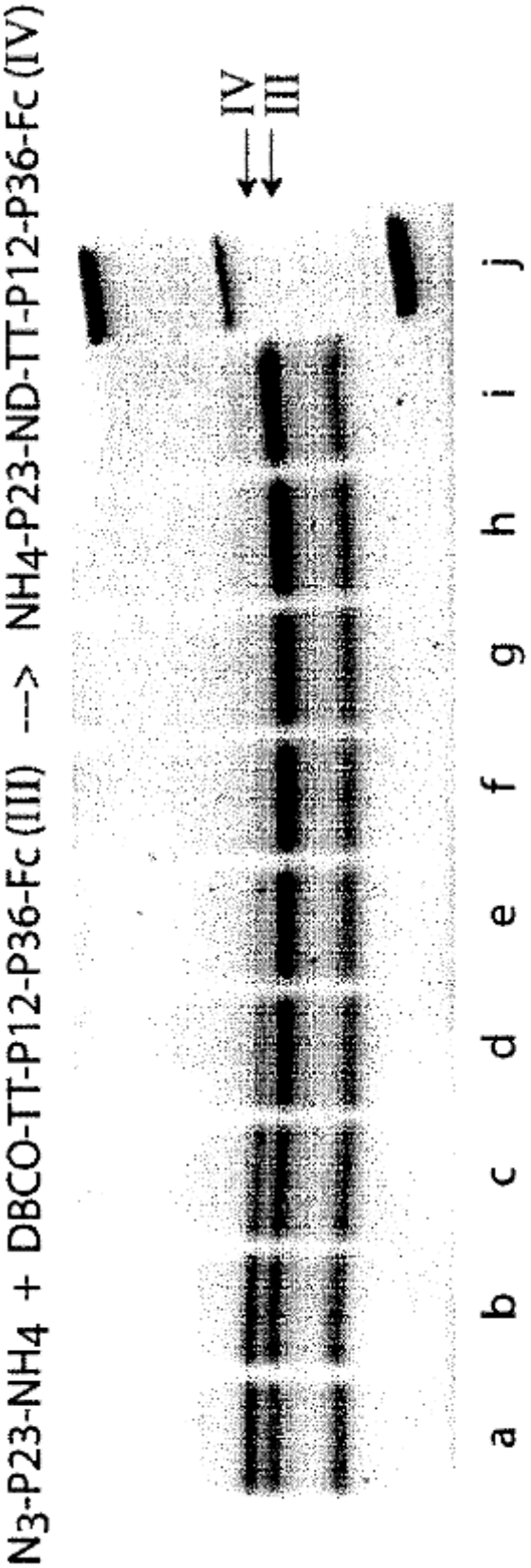

N3-P23-NH4 + DBCO-TT-P12-P36-Fc (III) ---> NH4-P23-ND-TT-P12-P36-Fc (IV)
IV
III
a b c d e f g h i j

Figura 50

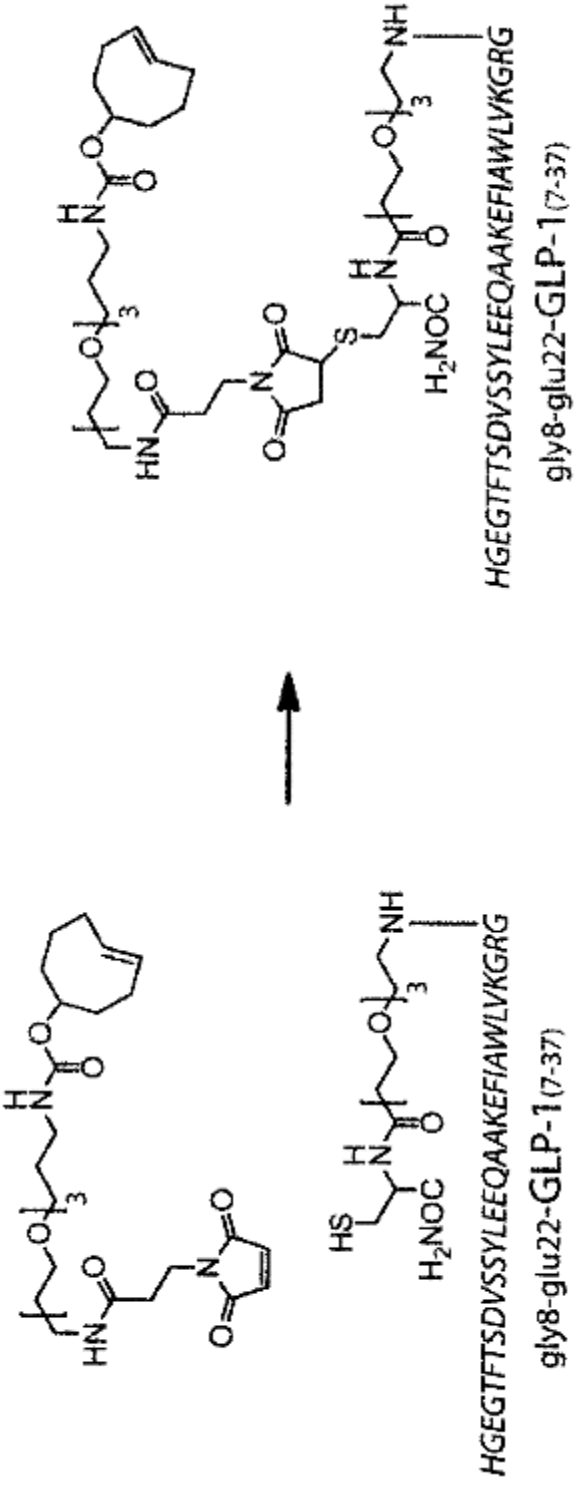

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
gly8-glu22-GLP-1(7-37)

Figura 51

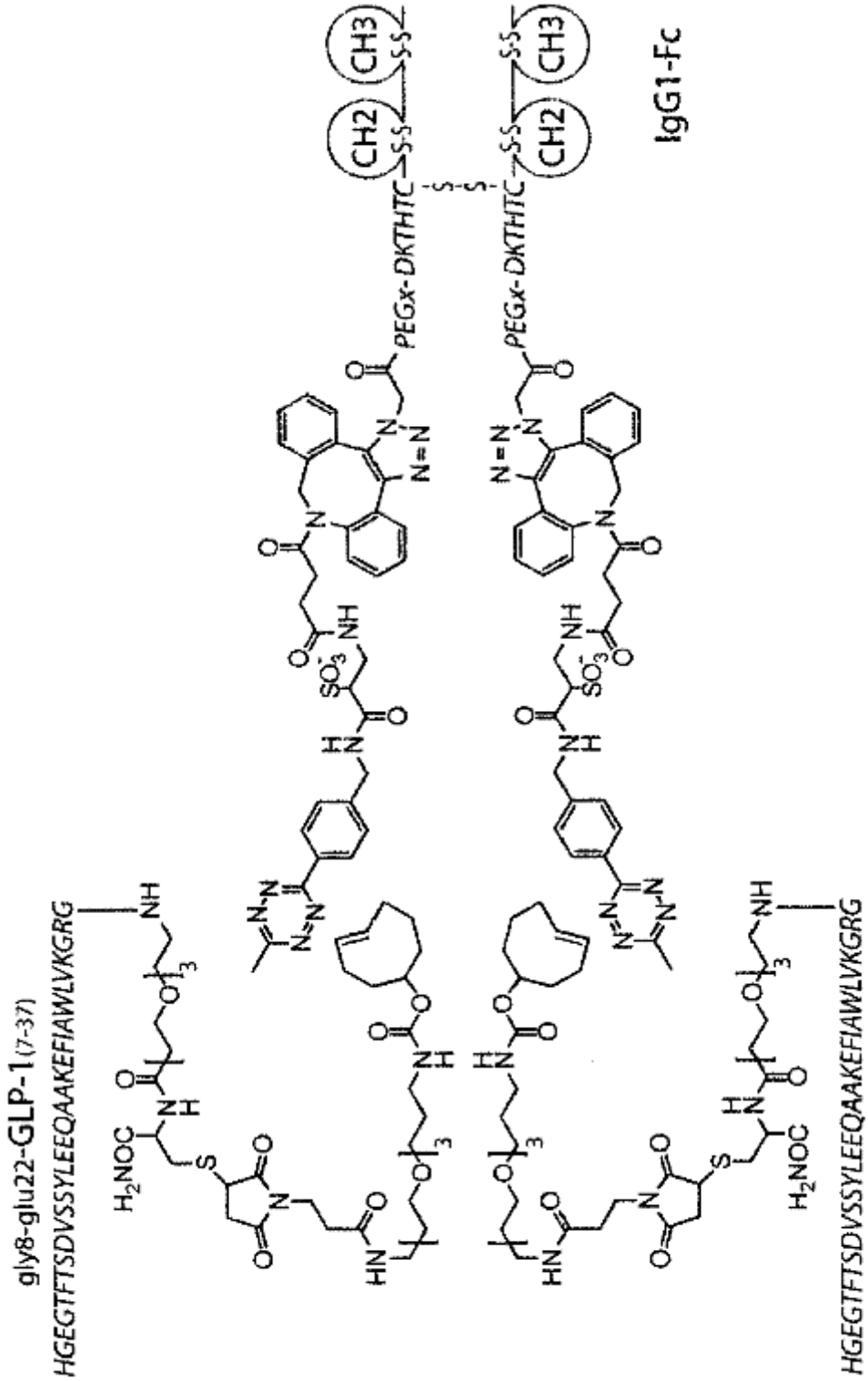

gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
IgG1-Fc
gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG

Figura 52

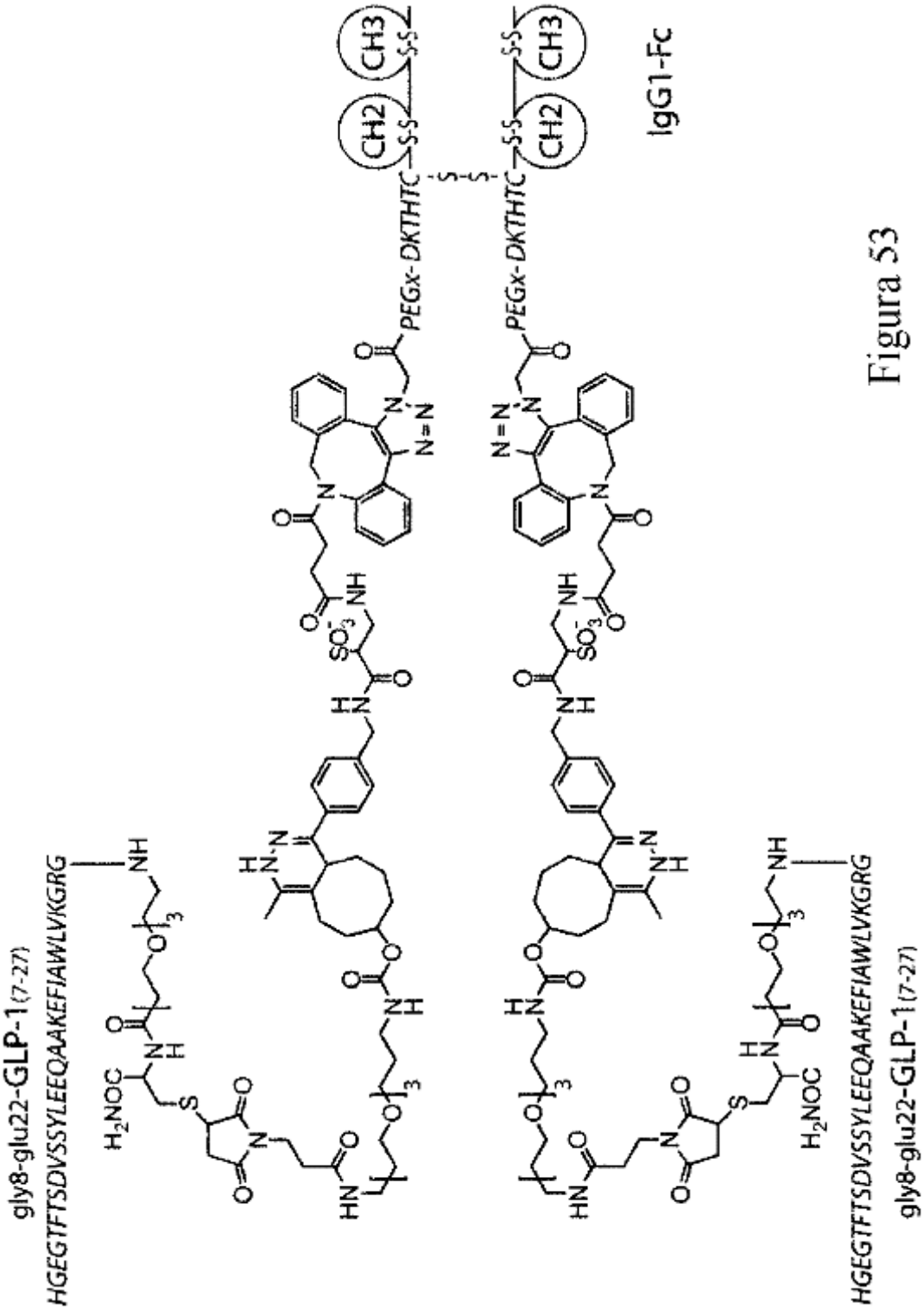

gly8-glu22-GLP-1(7-27)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
IgG1-Fc
gly8-glu22-GLP-1(7-27)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG

Figura 53

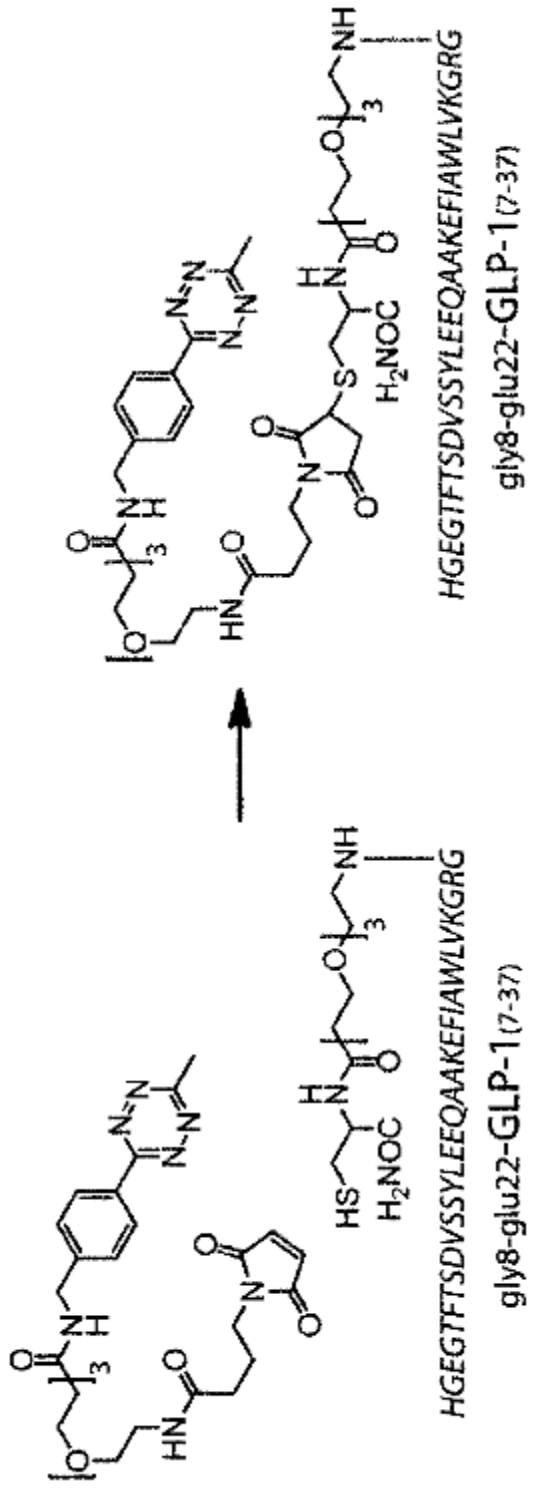

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
gly8-glu22-GLP-1(7-37)

Figura 54

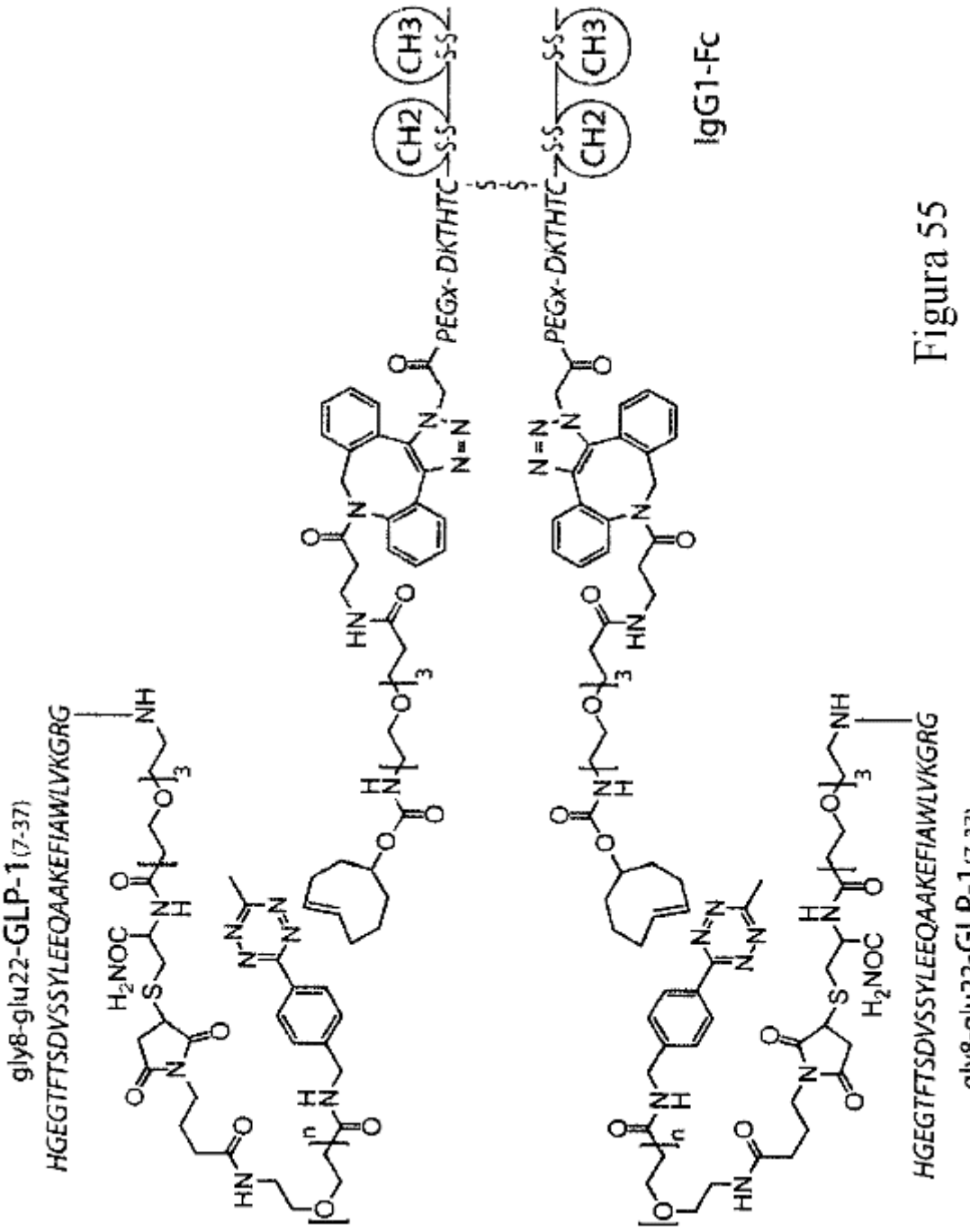

gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
IgG1-Fc
gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG

Figura 55

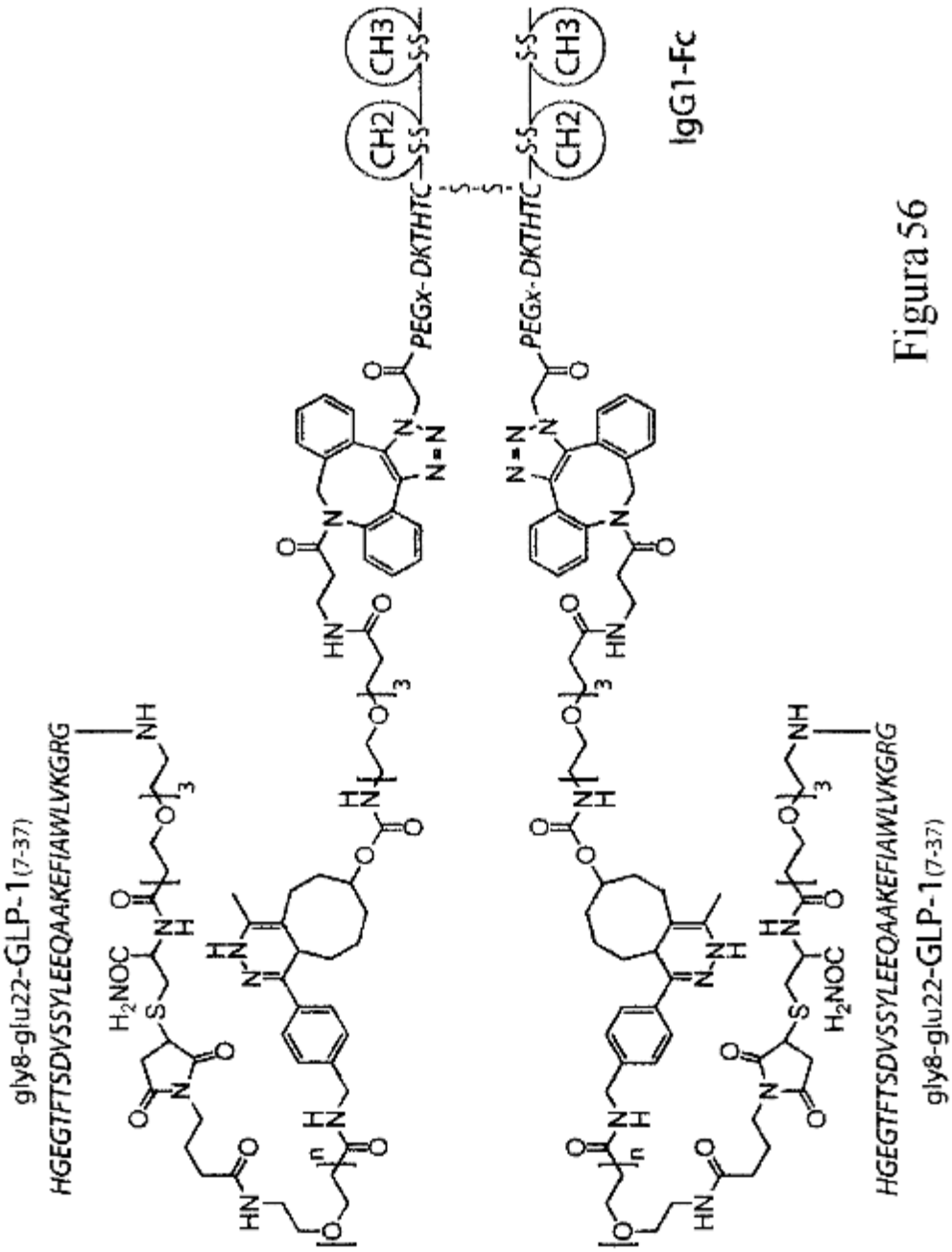

gly8-glu22-GLP-1(7-37)
HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRG
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
IgG1-Fc

Figura 56

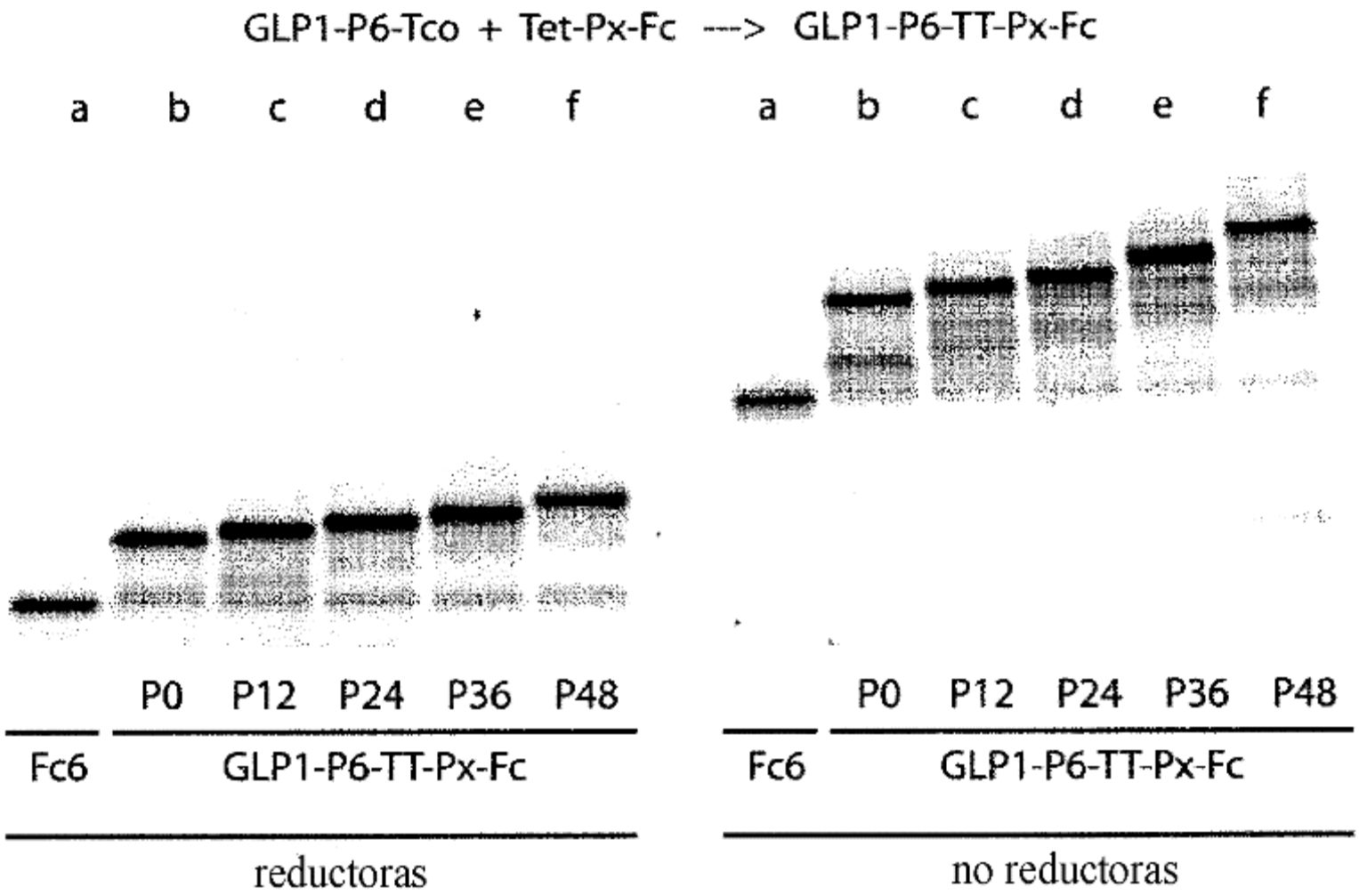

GLP1-P6-Tco + Tet-Px-Fc ---> GLP1-P6-TT-Px-Fc
a b c d e f
a b c d e f
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
GLP1-P6-TT-Px-Fc
reductoras
P0 P12 P24 P36 P48
Fc6
GLP1-P6-TT-Px-Fc
no reductoras

Figura 57

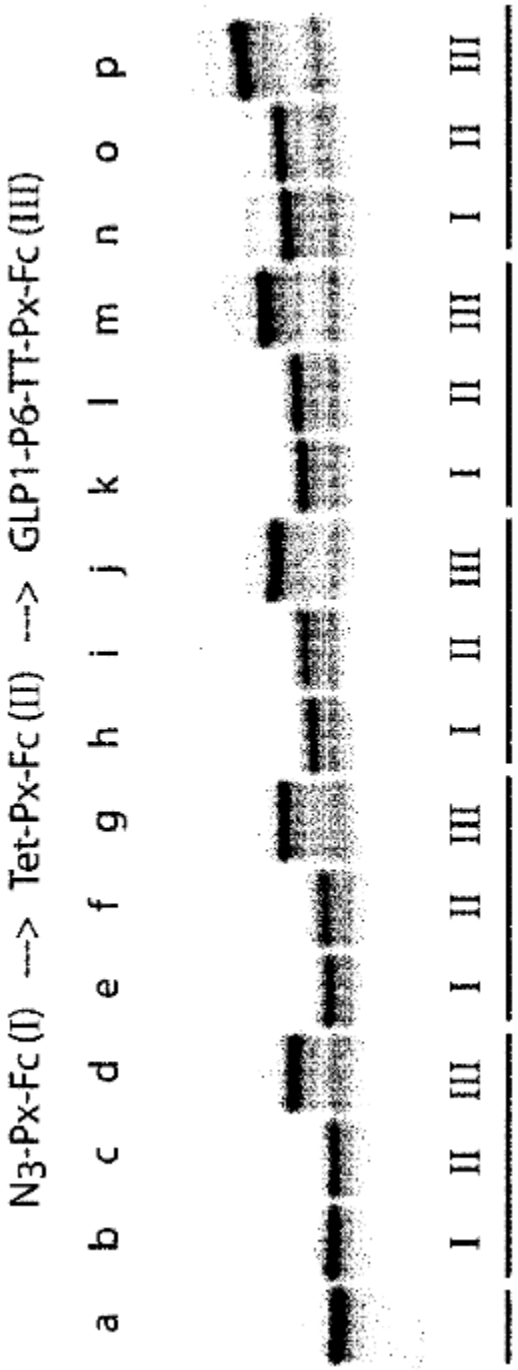

N3-Px-Fc (I) —> Tet-Px-Fc (II) —> GLP1-P6-TT-Px-Fc (III)
a b c d e f g h i j k l m n o p
Fc6
P0
P12
P24
P36
P48
I II III I II III I II III I II III I II III

Figura 58

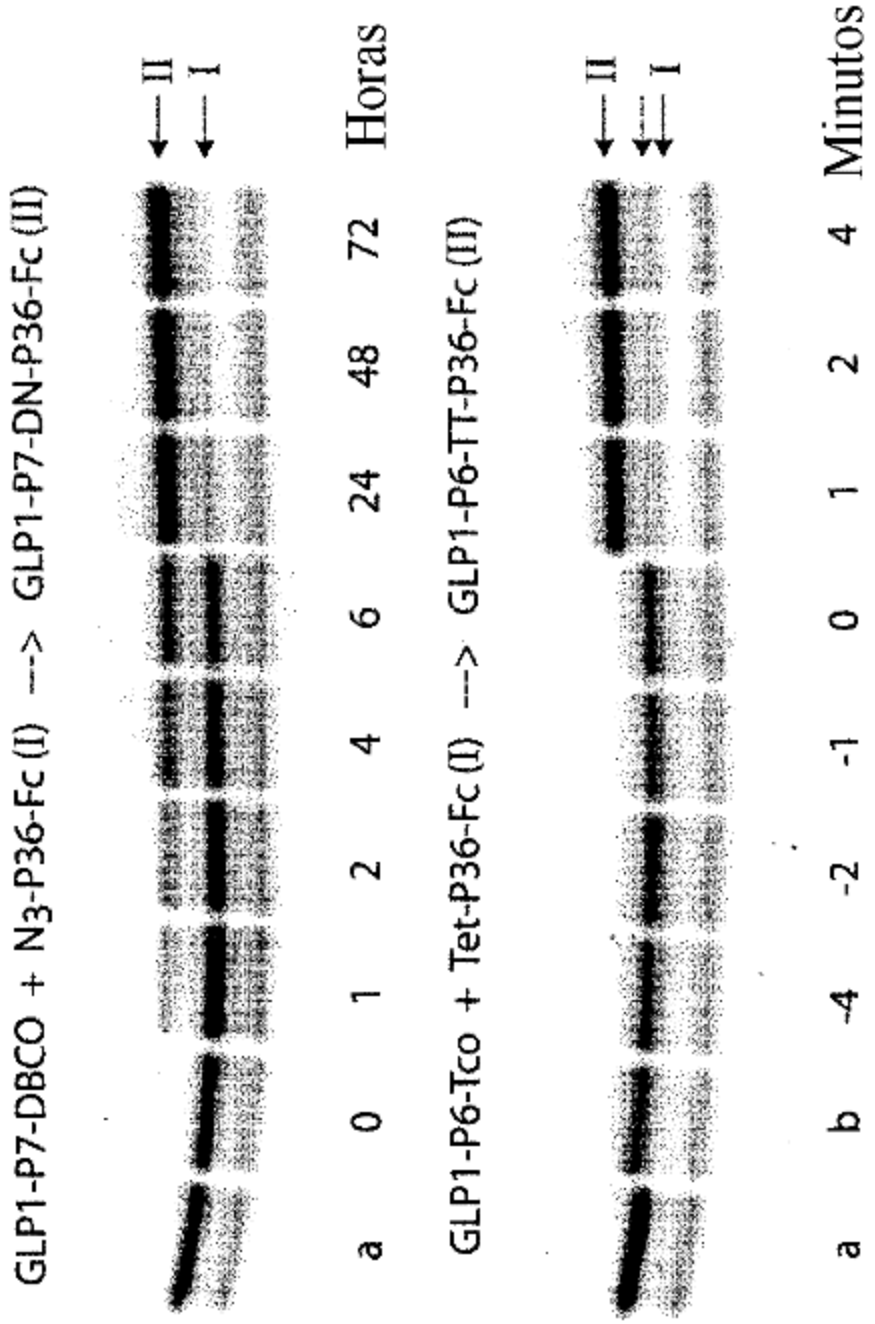

GLP1-P7-DBCO + N3-P36-Fc (I) --> GLP1-P7-DN-P36-Fc (II)
II
I
a 0 1 2 4 6 24 48 72 Horas
GLP1-P6-Tco + Tet-P36-Fc (I) --> GLP1-P6-TT-P36-Fc (II)
II
I
a b -4 -2 -1 0 1 2 4 Minutos

Figura 59

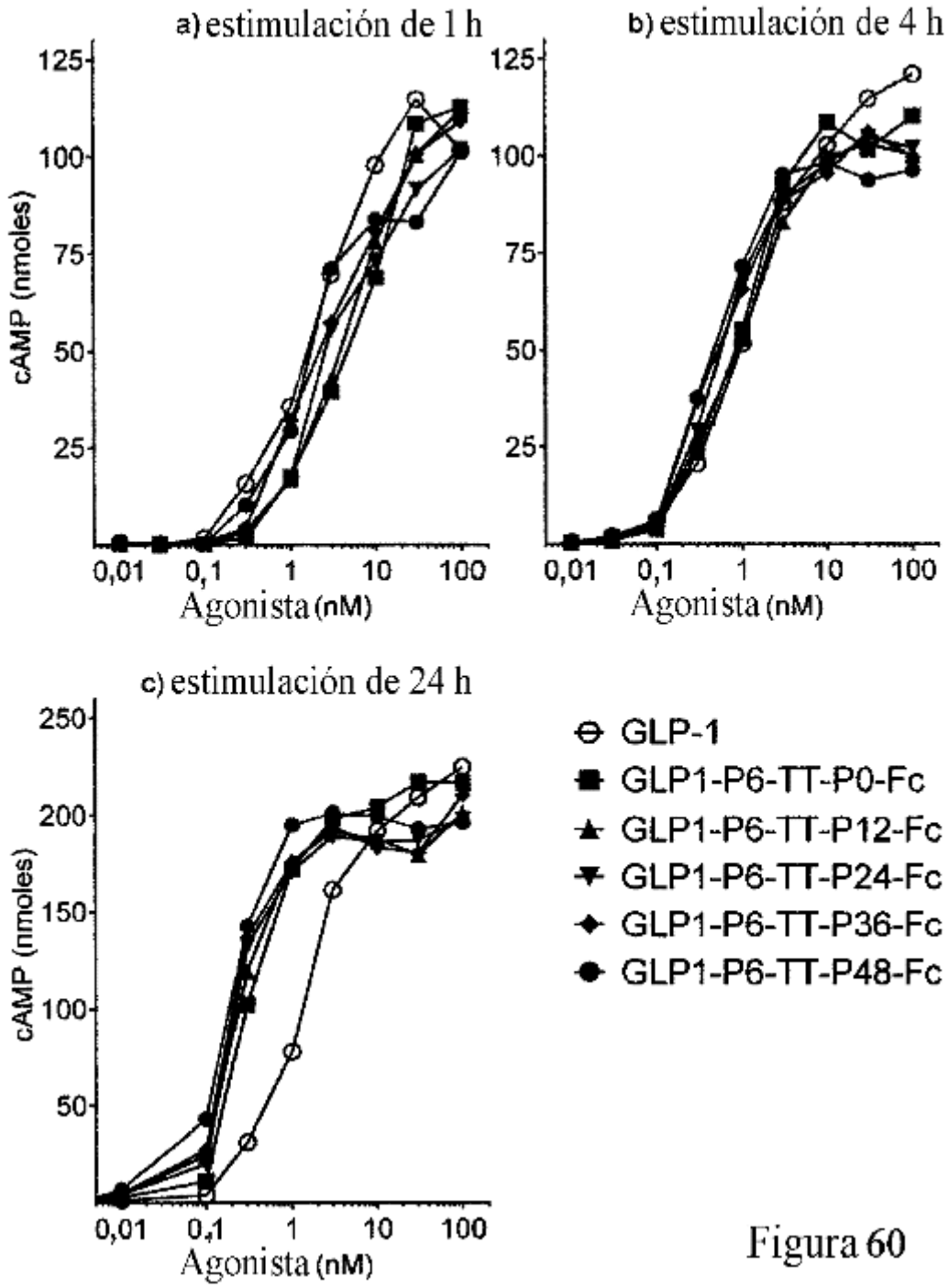

a) estimulación de 1 h
b) estimulación de 4 h
c) estimulación de 24 h
cAMP (nmoles)
Agonista (nM)
0,01
0,1
1
10
100
25
50
75
125
150
200
250
GLP-1
GLP1-P6-TT-P0-Fc
GLP1-P6-TT-P12-Fc
GLP1-P6-TT-P24-Fc
GLP1-P6-TT-P36-Fc
GLP1-P6-TT-P48-Fc

Figura 60

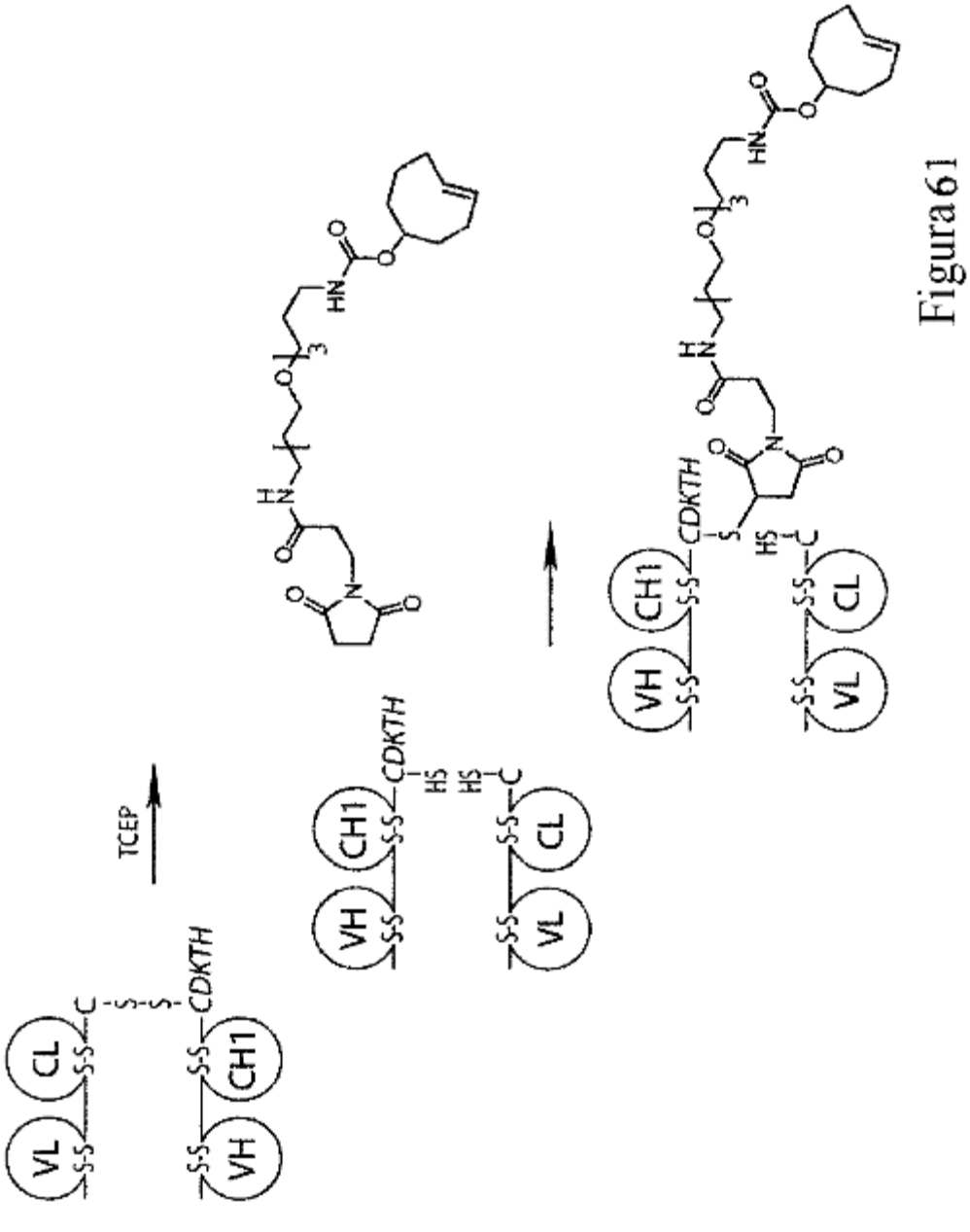


Figura 61

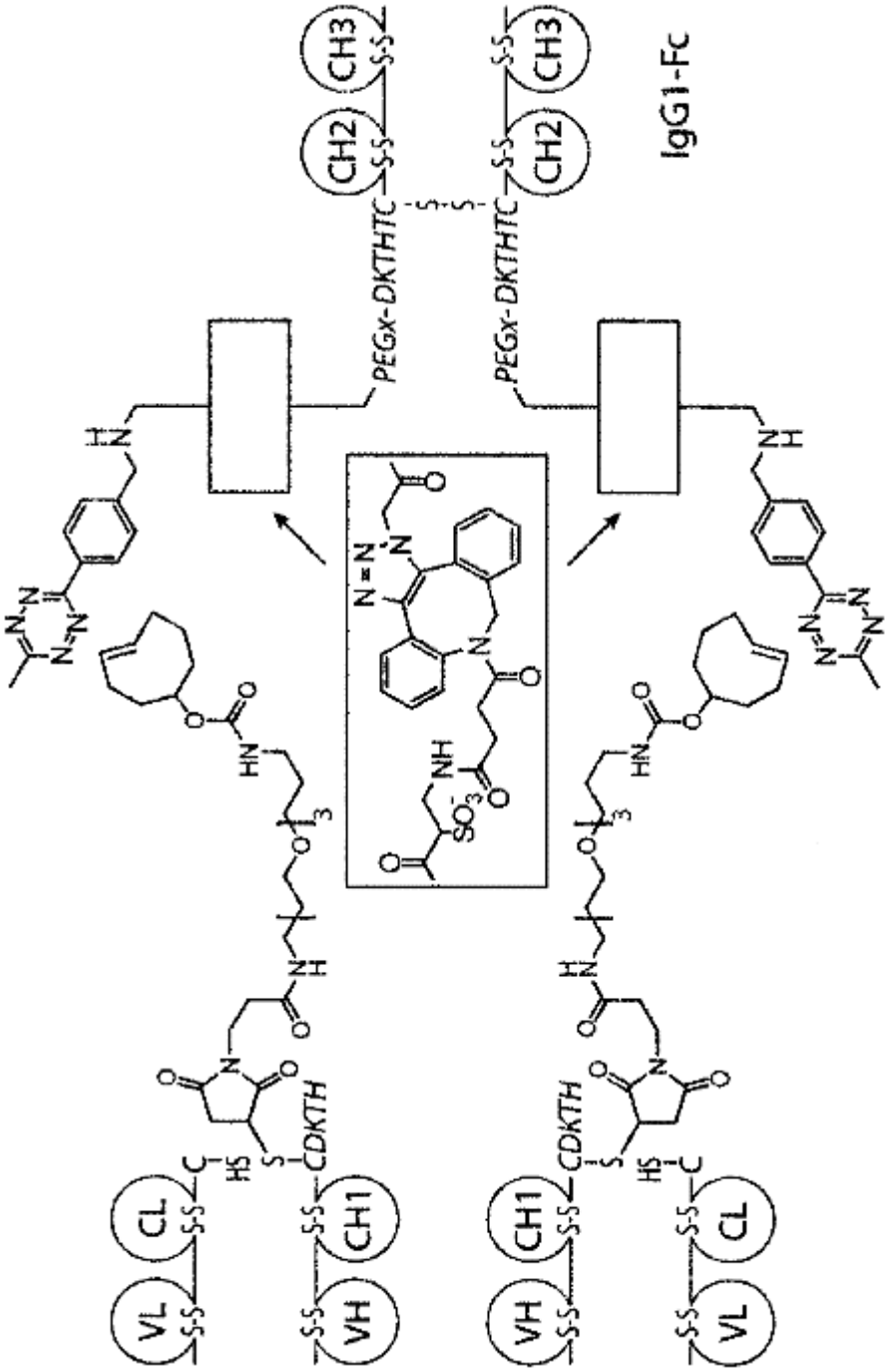

CH3
CH2
PEGx-DKTHTC
PEGx-DKTHTC
CH2
CH3
IgG1-Fc
VL
CL
VH
CH1
CDKTH
CDKTH
VH
CH1
VL
CL

Figura 62

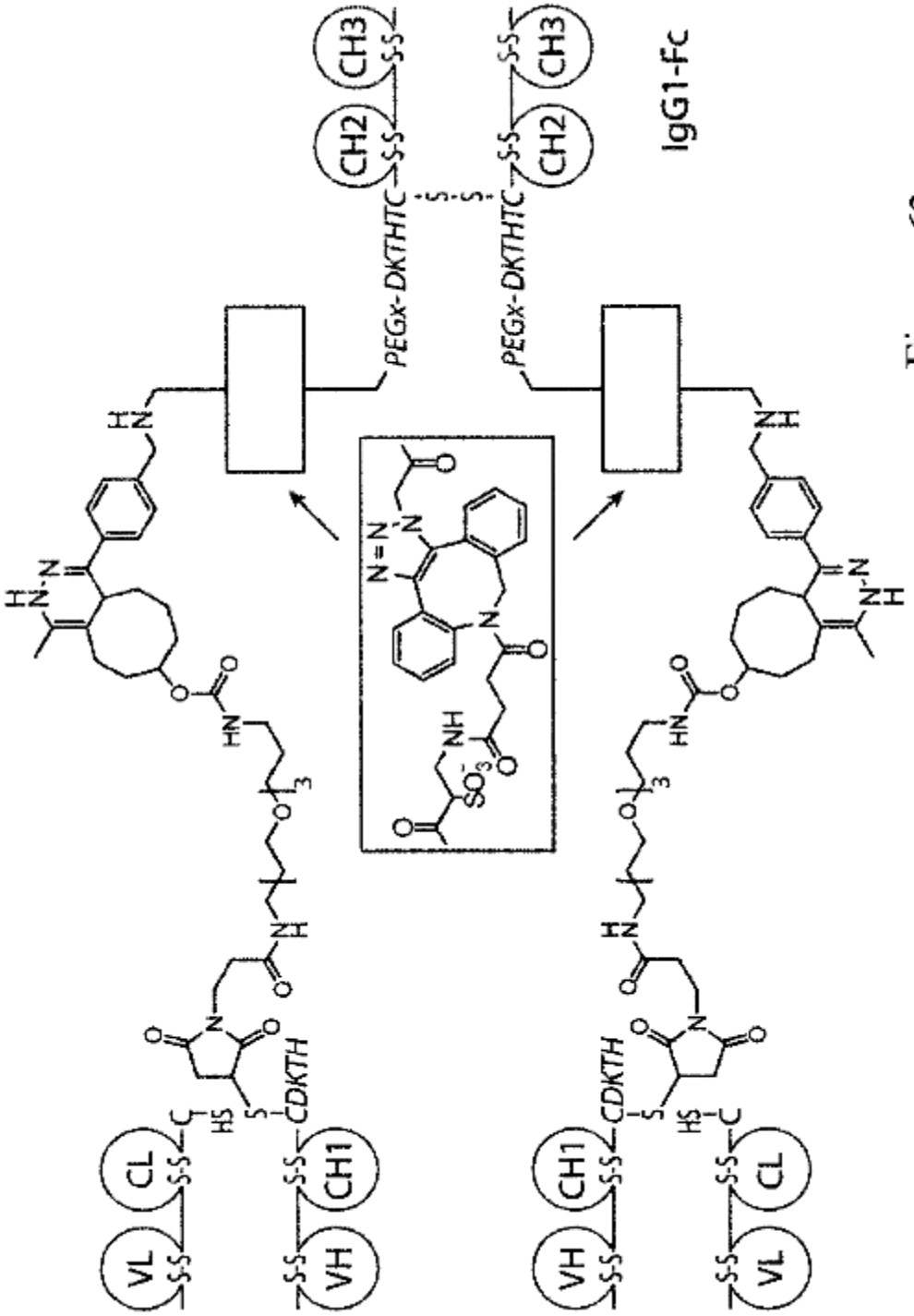

IgG1-Fc
PEGx-DKTHTC
PEGx-DKTHTC
CH3
CH2
CH3
CH2
CL
VL
CH1
VH
CDKTH
CDKTH
CH1
VH
CL
VL

Figura 63

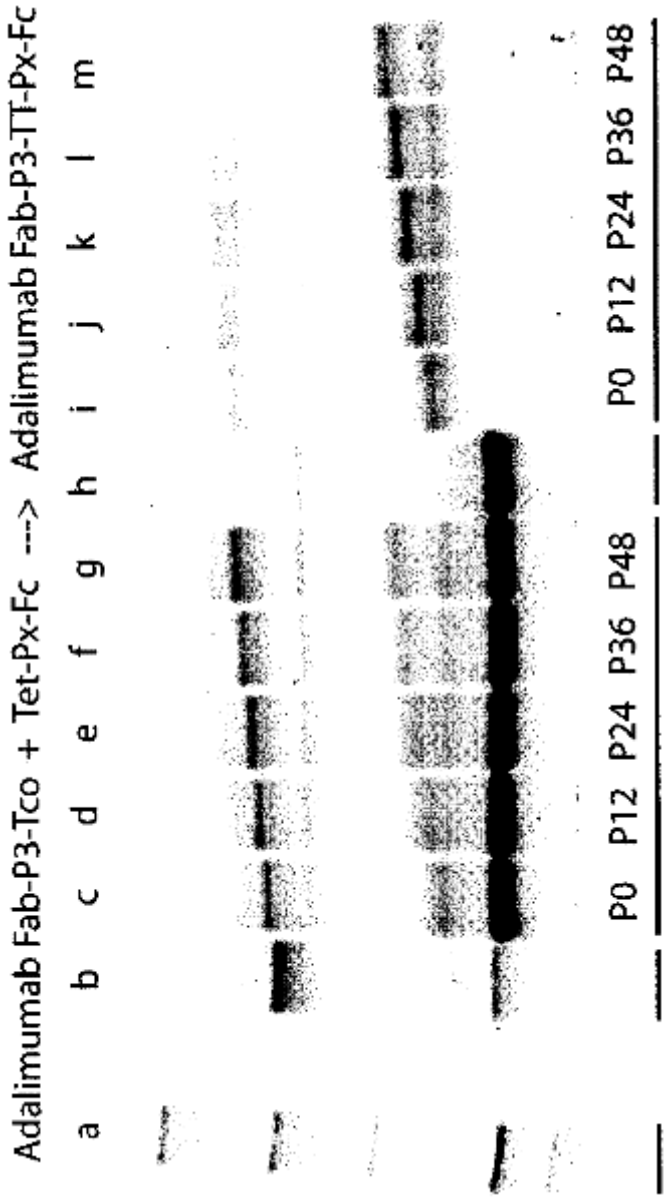

Adalimumab Fab-P3-Tco + Tet-Px-Fc ---> Adalimumab Fab-P3-TT-Px-Fc
a b c d e f g h i j k l m
M
Mab
P0 P12 P24 P36 P48
Fab-P3-TT-Px-Fc
Fab
P0 P12 P24 P36 P48
Tet-Px-Fc

Figura 64

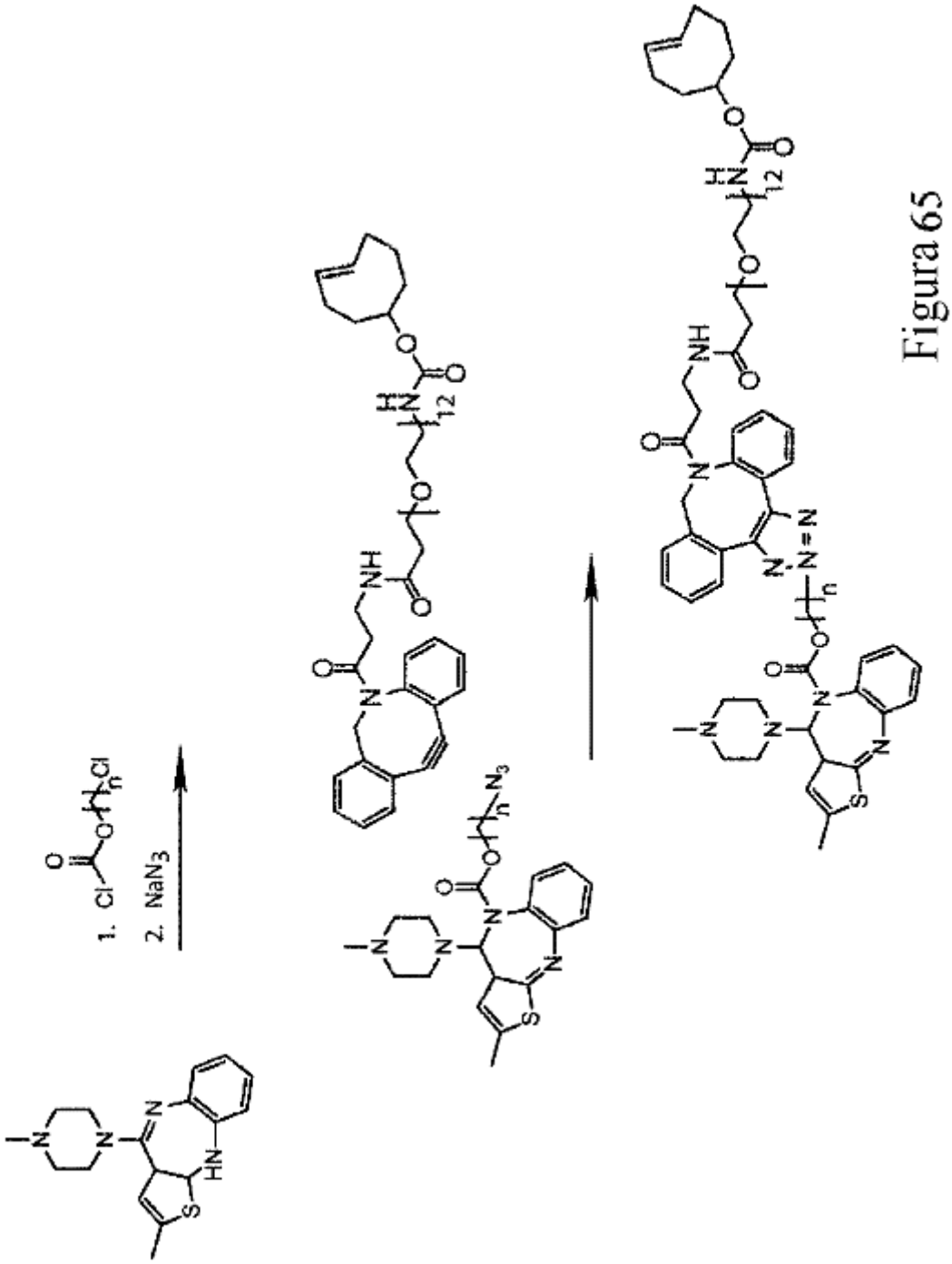


Figura 65

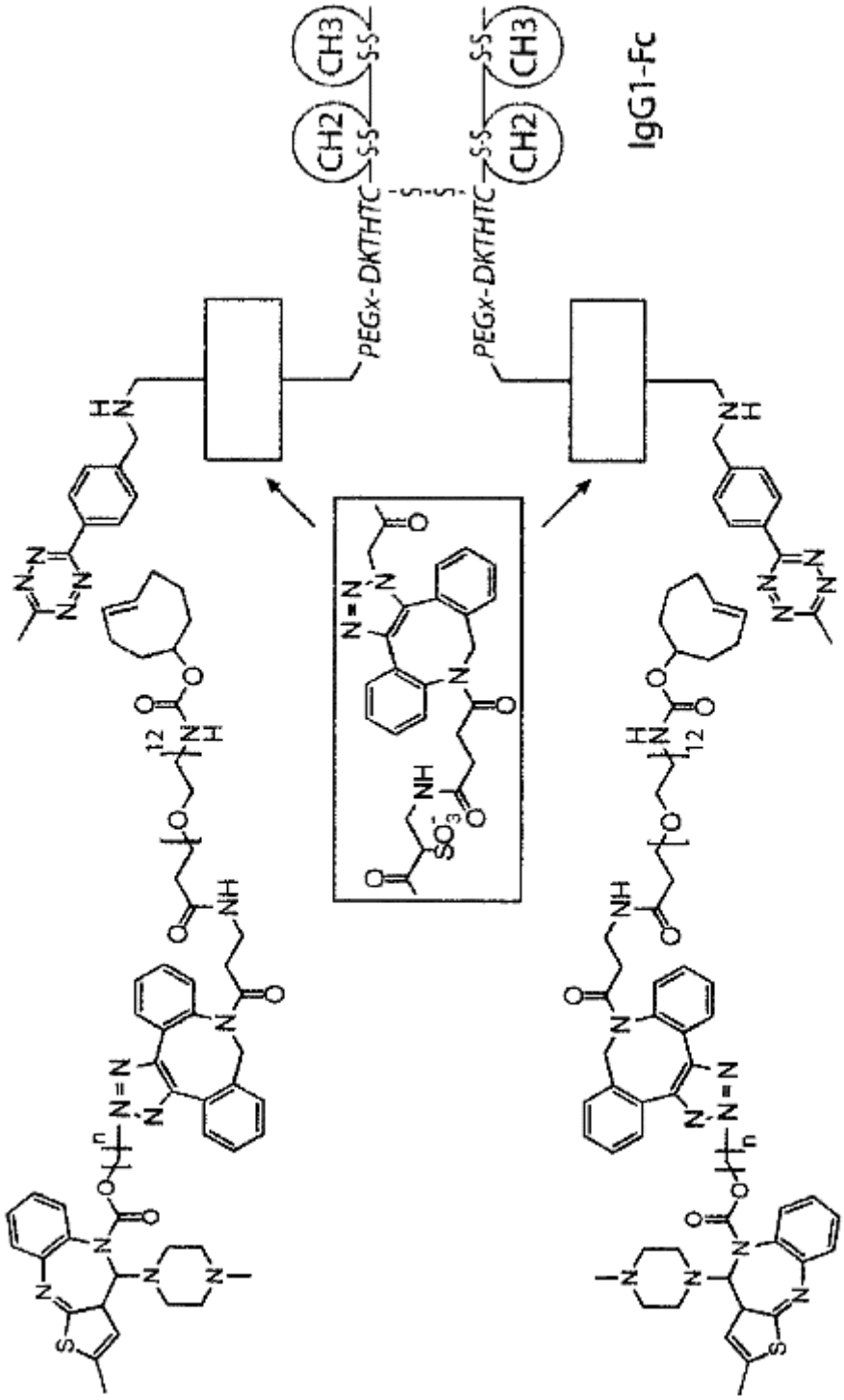


Figura 66

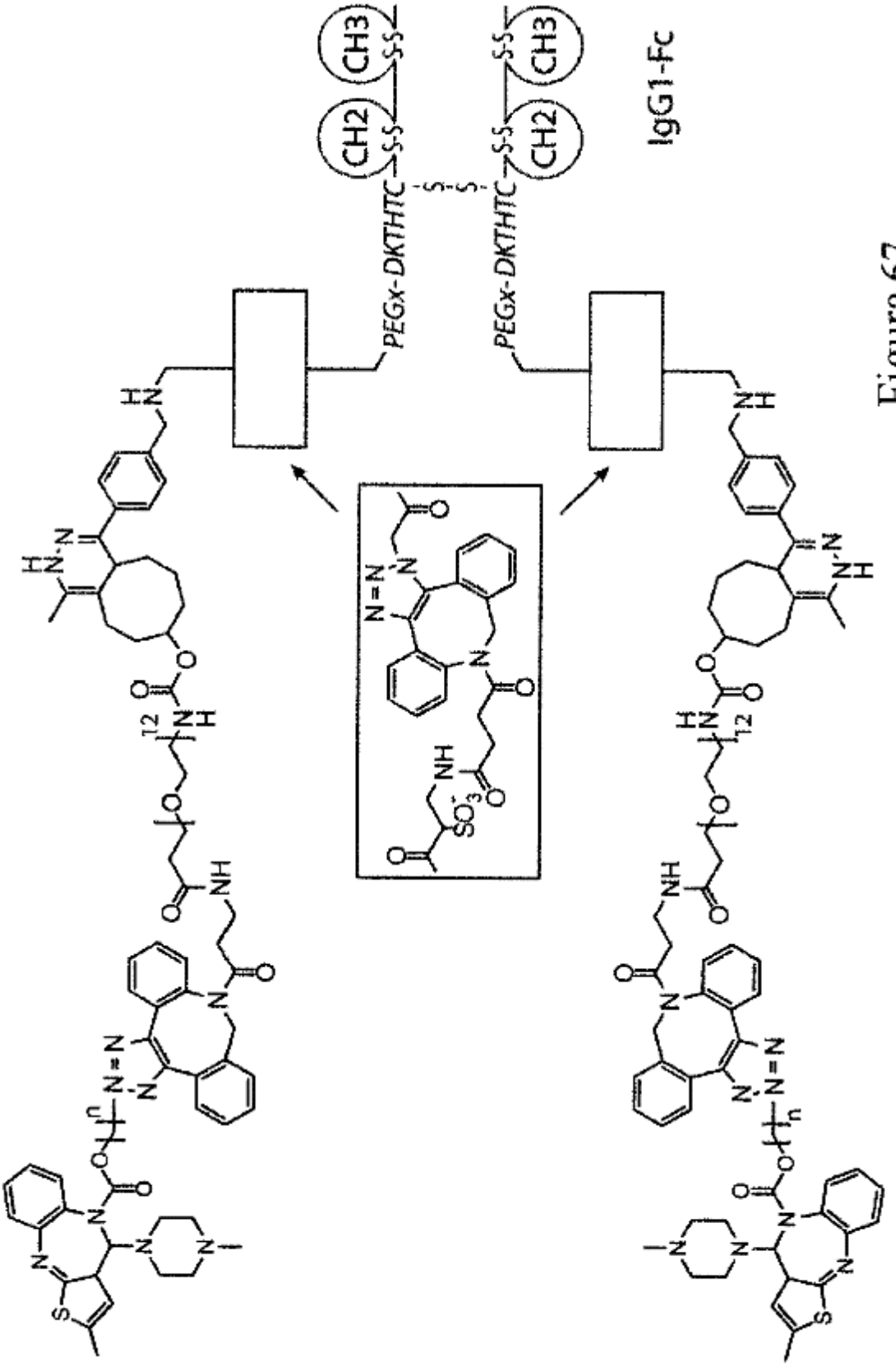


Figura 67