

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 151**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015** **PCT/US2015/066610**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16100788**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015** **E 15871152 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2020** **EP 3233920**

54 Título: **Proteínas de fusión Fc monocatenarias**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094242 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2021

73 Titular/es:

ALKERMES, INC. (100.0%)
852 Winter Street
Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

ALVARAZ, JUAN;
MOUSTAKAS, DEMETRI, T.;
BRODKIN, HEATHER, R. y
MCSWEENEY, LESLIE, A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 824 151 T3

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

Proteínas de fusión Fc monocatenarias

5 Antecedentes de la invención

Una estrategia para aumentar la semivida en suero de una proteína terapéutica es unir la proteína a un dominio Fc (fragmento cristizable) de un anticuerpo. Muchas de tales proteínas de fusión son capaces de formar homodímeros o heterodímeros formando de este modo moléculas de proteína de fusión de tipo anticuerpo. Sin embargo, muchos enfoques de la técnica anterior para la ingeniería de proteínas de fusión Fc tienen limitaciones incluyendo, pero sin limitación, inmunogenicidad y propiedades farmacocinéticas deficientes. Una proteína de fusión de estructura X-L1-bisagra-Fc como se define en las reivindicaciones en donde X es una fusión de VH y VL se desvela en los documentos WO 2014/018572 y WO 2013/026833. El documento WO 2011/122923 se refiere a muchas formas diferentes de Fc, incluyendo las que comprenden CH1 y/o CL. Se conocen proteínas de fusión Fc con el factor IX (FIX), TNFR2, antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1Ra), interferón (IFN) β , interleucina 10 (IL-10) e interleucina 2 (IL-2) por A. Linderholm *et al.*, BIOPROCESS INTERNATIONAL 2014, 12 (10), págs. 2-7, documento US 2013/217864, S Vallee *et al.*, JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, 2012, 32 (4), págs. 178-184, X. Zheng *et al.*, J. IMMUNOL., 1997, 158 (9), págs. 4507-4513, y X. Zheng *et al.*, J. IMMUNOL., 1999, 163 (7), págs. 4041-4048, respectivamente. Se conoce IL-2 permutada circularmente fusionada con el dominio extracelular de IL-2 R α por el documento US 2014/234962.

Se desvelan en el presente documento monómeros y dímeros de proteínas de fusión Fc que comprenden conectores que tienen dominios de inmunoglobulina ligero constante (CL) y pesado constante (CH1) de cadena sencilla. Dichos conectores también se denominan en el presente documento conectores scCLCH1.

Sin limitación a una teoría en particular, los conectores descritos en el presente documento reducen el impedimento estérico entre las cargas útiles de la proteína en cada una de las moléculas de proteínas de fusión Fc monocatenarias cuando dichas moléculas forman dímeros. El impedimento estérico puede dar lugar a pérdidas de bioactividad, dimerización ineficaz o reducción de la semivida de la molécula dimerica, por ejemplo, debido a la reducción de la unión al FcRn. Por tanto, la incorporación de los conectores desvelados en el presente documento puede dar lugar a mejora de la bioactividad, aumento de la formación de dímeros, aumento de la semivida y la capacidad de incorporar cargas útiles de proteínas mayores que las posibles en proteínas de fusión Fc anteriores. Además, algunas proteínas Fc desveladas en el presente documento pueden formar dímeros que proporcionan una estructura de anticuerpo más nativa alrededor del dominio Fc que puede mejorar la unión de las moléculas dimericas al receptor FcRn y, por lo tanto, aumentar la semivida en circulación de las proteínas de fusión Fc de la invención en comparación con proteínas de fusión de la técnica anterior.

Sumario de la invención

40 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión de cadena sencilla que tiene la siguiente disposición desde el extremo amino al extremo carboxilo:

X-L1-BISAGRA-Fc

45 en donde,

X es IL-10, IL-2, IL-2R α o fusiones del mismo, IFN β , factor IX, TNFR2 o IL-1Ra;
L1 es un conector que tiene la siguiente disposición desde el extremo amino al extremo carboxilo:

50 L2-CL-L3-CH1-L4

en donde,

L2 y L4 son de manera independiente conectores polipeptídicos y en donde L2 está presente y L4 está ausente;
L3 es un conector polipeptídico;
55 CL es un polipéptido de región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina; y
CH1 es un polipéptido de región constante de un dominio CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina;
BISAGRA es una secuencia de bisagra de una inmunoglobulina; y
Fc es el extremo carboxilo de una inmunoglobulina o cualquier fragmento activo de la misma.

60 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un complejo dimerizado que comprende la proteína de fusión del aspecto 1.

Se exponen elementos preferidos de la invención en las reivindicaciones dependientes del presente documento.

65 En el presente documento se desvelan proteínas de fusión Fc de cadena sencilla que tienen propiedades mejoradas. En el presente documento se desvelan fusiones monocatenarias de proteínas solubles fusionadas con la región Fc de

una inmunoglobulina mediante un conector que comprende una región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina (CL) ligada a una región constante CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina (conectores scCLCH1 o scCH1CL). Este conector confiere propiedades favorables a las proteínas de fusión Fc desveladas en el presente documento tales como mejor bioactividad y aumento de la semivida en comparación con sus homólogos de fusión que no son Fc o en comparación con proteínas de fusión Fc de la técnica anterior. Las proteínas de fusión Fc como se describen en el presente documento pueden diseñarse para incluir proteínas solubles de interés capaces de unirse o interactuar con cualquier diana de interés con alta especificidad y afinidad.

Una proteína de fusión Fc desvelada en el presente documento puede ser un dímero. Los dímeros pueden formarse mediante interacciones covalentes (p. ej., enlaces disulfuro) o no covalentes entre proteínas de fusión monocatenarias de la invención lo que da lugar a un complejo proteico homodimérico o heterodimérico que conserva las propiedades ventajosas de una molécula de anticuerpo para su uso como molécula terapéutica.

En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión Fc proporcionadas en el presente documento. También se proporcionan vectores, incluyendo vectores de expresión, que comprenden un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento. También se proporcionan células hospedadoras que contienen dichos vectores de expresión y métodos para producir las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento en las células hospedadoras.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que caracteres con la misma referencia se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, en su lugar, se pone énfasis en ilustrar los principios de la invención.

La fig. 1A es un diagrama de un homodímero de proteína de fusión Fc que comprende X fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 de acuerdo con la invención.

La fig. 1B es un diagrama de un heterodímero de proteína de fusión Fc de dos cadenas polipeptídicas, donde la primera comprende X fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1, y la segunda comprende Y, donde Y es diferente de X, fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 de acuerdo con la invención.

La fig. 1C es un diagrama de un homodímero de proteína de fusión Fc que comprende X fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCH1CL de acuerdo con la invención.

La fig. 1D es un diagrama de un heterodímero de proteína de fusión Fc de dos cadenas polipeptídicas, donde la primera comprende X fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCH1CL, y la segunda comprende Y, donde Y es diferente de X, fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCH1CL de acuerdo con la invención.

La fig. 2 es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende factor IX fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 de acuerdo con la invención.

La fig. 3 es un gráfico que muestra la actividad de coagulación de una proteína de fusión Fc que comprende factor IX fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 de acuerdo con la invención.

La fig. 4 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* en ratas cuando se administra por vía intravenosa una proteína de fusión Fc que comprende factor IX fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1.

La fig. 5A es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende TNFR2 fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 en condiciones reductoras.

La fig. 5B es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende TNFR2 fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 en condiciones no reductoras.

La fig. 6 es un gráfico que muestra la inhibición de la activación de un gen indicador por la proteína de fusión TNFR2 de la invención en comparación con una proteína de fusión directa de TNF convencional.

La fig. 7 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* en ratas cuando se administra por vía intravenosa una proteína de fusión Fc que comprende TNFR2 fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 en comparación con una proteína de fusión directa de TNF convencional.

La fig. 8A es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende IL1Ra fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 en condiciones reductoras.

La fig. 8B es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende IL1Ra fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 en condiciones no reductoras.

La fig. 9 es un gráfico que muestra la inhibición de la activación de un gen indicador por la proteína de fusión IL1Ra de la invención.

La fig. 10 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* en ratas cuando se administra por vía intravenosa una proteína de fusión Fc que comprende IL1Ra fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1.

La fig. 11 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* en ratas cuando se administra por vía intraocular una proteína de fusión Fc que comprende IL1Ra fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1.

La fig. 12A es un diagrama de un homodímero de proteína de fusión Fc de dos cadenas polipeptídicas, en donde en cada cadena polipeptídica comprende como X, una fusión de IL-2/IL-2R α que después se fusiona con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1.

La fig. 12B es un diagrama de un homodímero de proteína de fusión Fc de dos cadenas polipeptídicas, en donde en cada cadena polipeptídica comprende como X, una fusión de IL-2/IL-2R α que después se fusiona con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCH1CL.

La fig. 13 es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende IL-2/IL-2R α fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 (izquierda) o a través del nuevo conector scCH1CL (derecha) en condiciones reductoras y no reductoras.

La fig. 14A es un cromatograma que muestra la caracterización del IL-2/IL-2R α fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 mediante filtración analítica en gel.

La fig. 14B es un cromatograma que muestra la caracterización del IL-2/IL-2R α fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCH1CL mediante filtración en gel analítica.

La fig. 15 es un gráfico que muestra la activación de pSTAT5 por las proteínas de fusión monocatenarias IL-2/IL-2R α de la invención en comparación con rhIL-2.

La fig. 16 es un gráfico que muestra la semivida *in vivo* en ratas cuando se les administran por vía intravenosa y subcutánea las proteínas de fusión monocatenarias IL-2/IL-2R α de la invención.

La fig. 17 es un diagrama de un homodímero de proteína de fusión Fc de dos cadenas polipeptídicas, en donde en cada cadena polipeptídica comprende como X, IFN β que después se fusiona con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 de la invención.

La fig. 18 es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende IFN β fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 en condiciones reductoras y no reductoras.

La fig. 19 es un cromatograma que muestra la caracterización de IFN β fusionado con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 mediante filtración analítica en gel.

La fig. 20 es un gráfico que muestra la activación de un gen indicador por la proteína de fusión de IFN β de la invención.

La fig. 21 es un gráfico que muestra el perfil medio de concentración-tiempo después de la administración IV (1,4 nMoles/kg y SC (3,6 nMoles/kg) de la proteína de fusión de IFN β de la invención.

La fig. 22A es un diagrama de un homodímero de proteína de fusión Fc de dos cadenas polipeptídicas, en donde en cada cadena polipeptídica comprende como X, IL-10 que después se fusiona con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1.

La fig. 22B es un diagrama de un homodímero de proteína de fusión Fc de dos cadenas polipeptídicas, en donde en cada cadena polipeptídica comprende como X, IL-10 que después se fusiona con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCH1CL.

La fig. 23 es una SDS-PAGE que muestra la expresión de una proteína de fusión Fc que comprende IL-10 fusionada con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 (izquierda) o a través del nuevo conector scCH1CL (derecha) en condiciones reductoras y no reductoras.

La fig. 24A es un cromatograma que muestra la caracterización de la IL-10 fusionada con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCLCH1 mediante filtración analítica en gel.

La fig. 24B es un cromatograma que muestra la caracterización de la IL-10 fusionada con la región Fc de un anticuerpo IgG1 a través del conector scCH1CL mediante filtración en gel analítica.

La fig. 25 es un gráfico que muestra la estimulación de la línea de mastocitos de ratón MC/9 por las proteínas de fusión monocatenarias de IL-10 de la invención en comparación con la proteína de fusión Fc directa scIL-10 usada como control.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Por "polipéptido" se entiende cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, de la modificación postraducciona l o de la función. "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. Los polipéptidos también se pueden modificar mediante cualquiera de diversas formas químicas habituales (p. ej., se puede modificar un aminoácido con un grupo protector; el aminoácido carboxilo terminal se puede convertir en un grupo amida terminal; el resto amino terminal se puede modificar con grupos para, p. ej., mejorar la lipofilia; o el polipéptido se puede glucosilar químicamente o modificar de otro modo para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones de polipéptidos pueden incluir la unión de otra estructura tal como un compuesto cíclico u otra molécula al polipéptido y también pueden incluir polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos en una configuración alterada (es decir, R o S; o, L o D).

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente y se refieren a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se unen y reconocen específicamente un antígeno. Los genes de inmunoglobulina identificados incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los múltiples genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA,

IgD e IgE, respectivamente. Los términos entendidos por los expertos en la materia de tecnología de anticuerpos reciben cada uno el significado adquirido en la técnica, a menos que se definan expresamente de manera diferente en el presente documento. Se sabe que los anticuerpos tienen regiones variables, una región de bisagra y dominios constantes. Se revisan la estructura y la función de la inmunoglobulina, por ejemplo, en Harlow *et al.*, Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988).

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Las anotaciones "mg/kg" o "mg por kg" se refieren a miligramos por kilogramo. Todas las anotaciones se utilizan indistintamente a lo largo de la presente divulgación.

La "semivida" de un polipéptido se puede definir en general como el tiempo que tarda la concentración en suero del polipéptido en reducirse en 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del polipéptido y/o la eliminación o fijación del polipéptido por mecanismos naturales. La semivida se puede determinar de cualquier manera conocida en sí misma, tal como por análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas resultarán evidentes para el experto en la materia, y pueden, por ejemplo, implicar en general las etapas de administrar una dosis adecuada de un polipéptido a un roedor o primate; recoger muestras de sangre u otras muestras de un roedor o primate a intervalos regulares; determinar el nivel o concentración del polipéptido en dicha muestra de sangre; y calcular, a partir de (un gráfico de) los datos obtenidos de este modo, el tiempo hasta que el nivel o concentración del polipéptido se ha reducido en 50 % en comparación con el nivel inicial tras la dosificación. Se pueden encontrar métodos para determinar la semivida, por ejemplo, en Kenneth *et al.*, *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* (1986); Peters *et al.*, *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996); y "Pharmacokinetics", M Gibaldi y D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición rev. (1982).

La semivida de un polipéptido de fusión aumenta si su presencia en una matriz biológica (sangre, suero, plasma, tejido) persiste, *in vivo*, durante un periodo más largo en comparación con un control adecuado. La semivida puede aumentar en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más en comparación con un control adecuado.

La semivida se puede expresar utilizando parámetros tales como el $t_{1/2\text{-}\alpha}$, $t_{1/2\text{-}\beta}$ y HL_Lambda_z . En la presente memoria descriptiva, un "aumento de la semivida" se refiere a un aumento de uno cualquiera de estos parámetros, dos cualesquiera de estos parámetros, o los tres parámetros. Un "aumento de la semivida" en particular se refiere a un aumento del $t_{1/2\text{-}\beta}$ y/o HL_Lambda_z , ya sea con o sin un aumento del $t_{1/2\text{-}\alpha}$. Otros parámetros farmacocinéticos que pueden evaluarse incluyen el volumen de distribución (VD), aclaramiento (CL) y tiempo medio de residencia (TMR) y el área bajo la curva (ABC). En la presente memoria descriptiva, un "cambio de la farmacocinética" se refiere a cambios en uno cualquiera de estos parámetros, dos cualesquiera de estos parámetros, tres cualesquiera de estos parámetros o los cuatro parámetros, en presencia o ausencia de cambios en los parámetros de semivida enumerados anteriormente.

"Actividad" para los fines del presente documento se refiere a una acción o un efecto de un componente de una proteína de fusión coherente con, pero no necesariamente idéntico a, el de la proteína activa nativa correspondiente, en donde "actividad biológica" o "actividad" se refiere a una función o un efecto biológico *in vitro* o *in vivo*, incluyendo, pero sin limitación, unión a receptor, actividad antagonista, actividad agonista o respuesta celular o fisiológica.

Como se usa en el presente documento, un "complejo dimérico" comprende dos proteínas de fusión X-L1-BISAGRA-Fc monocatenarias de la invención, en donde los dos polipéptidos monocatenarios se asocian entre sí en condiciones adecuadas mediante unión no covalente o unión covalente, por ejemplo, por un enlace disulfuro. Una "proteína heterodimérica", "complejo heterodimerizado" o "heterodímero", como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a una proteína que está hecha de dos polipéptidos X-L1-BISAGRA-Fc monocatenarios que forman un complejo dimérico, en donde dichos dos polipéptidos monocatenarios tienen diferentes secuencias de aminoácidos, en particular, X representa diferentes proteínas solubles o diferentes partes de la misma proteína soluble. Una "proteína homodimérica", "complejo homodimerizado" u "homodímero" como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a una proteína que está hecha de dos polipéptidos idénticos o sustancialmente idénticos que forman el complejo dimérico, en donde dichos dos polipéptidos monocatenarios comparten 100 % de identidad, o al menos 95 % o al menos 99 % de identidad, consistiendo las diferencias de aminoácidos en la sustitución, adición o supresión de aminoácidos que no afectan a las propiedades funcionales y físicas del polipéptido en comparación con el otro del homodímero, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras.

Como se usa en el presente documento, una proteína es "soluble" cuando carece de cualquier dominio transmembrana o dominio proteico que ancle o integre el polipéptido en la membrana de una célula que exprese dicho polipéptido.

Como se usa en el presente documento, "dominio Fc", "región Fc" o "parte Fc" como se pueden usar esos términos indistintamente en el presente documento para describir una proteína de fusión X-L1-BISAGRA-Fc de la invención, abarca dominios procedentes de la región constante de una inmunoglobulina, preferentemente una inmunoglobulina humana, incluyendo un fragmento activo, de la región constante. Las inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y otras clases tales como IgA, IgD, IgE e IgM. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido de origen natural o producido de forma sintética homólogo de la región C-terminal de inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, por separado o en combinación.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar", o "paliar" o "aliviar" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo, pero sin limitación, un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se esté tratando. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente, de manera que se observa una mejora en el sujeto, independientemente de que el sujeto pueda estar aún aquejado del trastorno subyacente.

Para el beneficio profiláctico, las composiciones pueden administrarse a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad en particular o a un sujeto que presente uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque pueda no haberse realizado un diagnóstico de esta enfermedad.

Un "efecto terapéutico", como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto fisiológico, incluyendo, pero sin limitación, la curación, la mitigación, mejora o prevención de enfermedad en seres humanos u otros animales o de otro modo mejorar el bienestar físico o mental de seres humanos o animales, provocado por una proteína de fusión de la invención.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "dosis terapéuticamente eficaz", como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad de una proteína activa, ya sea sola o como parte de una composición de proteínas de fusión, que es capaz de tener cualquier efecto beneficioso, detectable, sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o característica de una patología o afección cuando se administra en una o repetidas dosis a un sujeto. No es necesario que dicho efecto sea absoluto para ser beneficioso.

La expresión "pauta posológica terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a un programa para dosis administradas consecutivamente de una proteína activa, ya sea sola o como parte de una composición de proteínas de fusión, en donde las dosis se administran en cantidades terapéuticamente eficaces para dar lugar a un efecto beneficioso sostenido sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o característica de una patología o afección.

Proteínas de fusión Fc monocatenarias

Las proteínas de fusión Fc monocatenarias desveladas en el presente documento tienen la siguiente disposición desde el extremo amino (extremo N) hasta el extremo carboxilo (extremo C):

X-L1-BISAGRA-Fc

en donde, X es una proteína soluble;

L1 es un conector que tiene la siguiente disposición desde el extremo amino al extremo carboxilo:

L2-CL-L3-CH1-L4 o L2-CH1-L3-CL-L4

en donde,

L2 y L4 son de manera independiente conectores polipeptídicos o están ausentes de manera independiente, L3 es un conector polipeptídico;

CL es un polipéptido de región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina; y

CH1, un polipéptido de región constante de un dominio CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina;

BISAGRA es una secuencia de bisagra de una inmunoglobulina o está ausente con la condición de que si BISAGRA está ausente, L4 está presente; y

Fc es el extremo carboxilo de una inmunoglobulina o cualquier fragmento activo o derivado de la misma.

Una proteína soluble de interés se fusiona con la región N-terminal de una región Fc de inmunoglobulina a través de

un conector (L1) que se obtiene de los dominios CL y CH1 de una inmunoglobulina dispuesta como una cadena sencilla (sc) también denominada en el presente documento "conectores scCLCH1".

El extremo C de la región CL está unido a la región N-terminal de una región CH1 a través del conector polipeptídico L3. El extremo N de la región CL puede fusionarse con el extremo C de la proteína de interés (X) a través de un conector polipeptídico L2 opcional. El extremo C del dominio CH1 está unido al dominio Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina (BISAGRA) o un conector polipeptídico (L4) o tanto una bisagra (BISAGRA) como un conector polipeptídico (L4).

El extremo C del dominio CH1 está unido al extremo N de una región CL a través del conector polipeptídico L3. El extremo N de la región CH1 puede fusionarse con el extremo C de la proteína de interés (X) a través de un conector polipeptídico L2 opcional. El extremo C de la región CL está unido a la región Fc a través de una región bisagra de inmunoglobulina (BISAGRA) o un conector polipeptídico (L4) o tanto una bisagra (BISAGRA) como un conector polipeptídico (L4).

Preferentemente, L3 se selecciona de dominios artificiales flexibles que comprenden aminoácidos seleccionados de Gly (G) y/o Ser (S). Preferentemente, el conector está compuesto por polipéptido de fórmula general (Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 21))_n o (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 22))_n en donde n es un número entero de 1 a 10. Preferentemente, cada conector es un polipéptido que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-50 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-25 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-15 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-10 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 4-24 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 5-20 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 5-15 aminoácidos y preferentemente, aproximadamente 5-10 aminoácidos. Preferentemente, el conector es (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 22))_n en donde n es 2 o 4.

L2 y L4 se seleccionan independientemente de dominios flexibles artificiales que comprenden aminoácidos seleccionados de, por ejemplo, Gly (G) y Ser (S). Preferentemente, el conector está compuesto por polipéptido de fórmula general (Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 21))_n o (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 22))_n en donde n es un número entero de 1 a 10. Preferentemente, cada conector es un polipéptido que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-50 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-25 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-15 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 1-10 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 4-24 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 5-20 aminoácidos, preferentemente, aproximadamente 5-15 aminoácidos y preferentemente, aproximadamente 5-10 aminoácidos. Preferentemente, el conector es (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 22))_n en donde n es 2 o 4.

L2, L3 y L4, pueden comprender además aminoácidos tales como, por ejemplo, Lys (K), Thr (T), Glu (E) y Asp (D).

La región CL del conector scCLCH1 (L1) puede ser sustancialmente idéntica a la región CL correspondiente de las inmunoglobulinas nativas que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La región CL (L1) puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la región CL correspondiente de inmunoglobulinas nativas que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Si la región CL de L1 es un derivado modificado o una variante de una región CL nativa, dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, inserciones, supresiones, sustituciones y reordenamientos de aminoácidos. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la región CL de acuerdo con la invención, es al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente al menos 95 % idéntica a la región CL correspondiente de inmunoglobulinas nativas que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

La región CH1 del conector scCLCH1 (L1) puede ser sustancialmente idéntica a la región CH1 correspondiente de las inmunoglobulinas nativas que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La región CH1 de L1 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la región CH1 correspondiente de inmunoglobulinas nativas que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Si la región CH1 del conector L1 es un derivado modificado o una variante de una región de inmunoglobulina CH1 nativa, dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, inserciones, supresiones, sustituciones y reordenamientos de aminoácidos. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la región CH1 es al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente al menos 95 % idéntica a la región CH1 correspondiente de inmunoglobulinas nativas que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

No es necesario que la región CH1 y las regiones CL de L1 sean idénticas a, o una variante de, las regiones correspondientes de la misma clase de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la región CL puede proceder de la región correspondiente de IgE y la región CH1 puede proceder de la región correspondiente de IgG.

- 5 Preferentemente, CL y CH1 del conector scCLCH1 proceden de las regiones CL y CH1 correspondientes de IgG1, preferentemente, IgG1 humana.

Una región CL ilustrativa correspondiente a la región CL de una IgG1 humana (hIgG1) incluye:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES (SEQ ID
NO: 1).

10

Una región CH1 ilustrativa correspondiente a la región CH1 de hIgG1 incluye:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO: 2).

15

Las proteínas de fusión Fc monocatenarias desveladas en el presente documento comprenden una región Fc que incluye al menos una parte del extremo carboxilo de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, la parte Fc puede comprender: un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4, un dominio CH2-CH3, un dominio CH2-CH4, un dominio CH2-CH3-CH4, un dominio bisagra-CH2, un dominio bisagra-CH2-CH3, un dominio bisagra-CH2-CH4 o un dominio bisagra-CH2-CH3-CH4. El dominio Fc puede proceder de anticuerpos que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulina, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferentemente, la región Fc procede de IgG1, preferentemente IgG1 humana.

20

El dominio Fc puede ser una secuencia Fc de origen natural que pertenece a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, incluyendo variantes alélicas o de corte y empalme naturales. Como alternativa, el dominio Fc puede ser un dominio híbrido que comprende una parte de un dominio Fc de dos o más isotipos Ig diferentes, por ejemplo, un dominio Fc híbrido de IgG2/IgG4. Preferentemente, el dominio Fc procede de una molécula de inmunoglobulina humana. Como alternativa, el dominio Fc puede ser una versión humanizada o desinmunizada (eliminación de epítopos de linfocitos T que pueden activar linfocitos T auxiliares) de un dominio Fc de un animal no humano, incluyendo, pero sin limitación, ratón, rata, conejo y mono.

25

30

El dominio Fc puede ser una secuencia de Fc variante, p. ej., una secuencia de Fc que se ha modificado (p. ej., por sustitución, supresión y/o inserción de aminoácidos) en relación con una secuencia de Fc parental (p. ej., un polipéptido Fc sin modificar que se modifica posteriormente para generar una variante), para proporcionar características estructurales y/o actividad biológica deseables. Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones en la región Fc para generar una variante de Fc que (a) tiene mayor o menor citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), (b) mayor o menor citotoxicidad mediada por complemento (CDC), (c) tiene mayor o menor afinidad por C1q y/o (d) tiene mayor o menor afinidad por un receptor de Fc en relación con el Fc precursor. Dichas variantes de la región Fc comprenderán en general al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. Se considera que la combinación de modificaciones de aminoácidos es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc. sustituciones en la misma, p. ej., de las posiciones de la región Fc específicas identificadas en el presente documento.

35

40

La región bisagra de las proteínas de fusión Fc de la invención puede proceder de anticuerpos que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. La región de bisagra puede proceder de cualquiera de las subclases de anticuerpos IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La región bisagra puede contener de forma natural un resto de cisteína o puede modificarse por ingeniería genética para que contenga uno o más restos de cisteína.

45

Preferentemente, la región bisagra puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la región bisagra correspondiente de inmunoglobulinas nativas que pertenecen a cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o cualquiera de las subclases de anticuerpo IgG, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la región bisagra es al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 % y más preferentemente al menos 95 % idéntica a la región bisagra correspondiente de IgG1 humana.

55

A continuación se muestra la secuencia de una región constante de inmunoglobulina IgG1 humana y la posición relativa de la región bisagra se indica mediante subrayado continuo:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 3). La región CH1 se indica mediante subrayado con una línea de puntos y las regiones CH2 y CH3 se indican con letras en negrita. La lisina C-terminal de una secuencia de IgG se puede eliminar o reemplazar con un aminoácido distinto de lisina, tal como alanina, para aumentar adicionalmente la semivida en suero de la proteína de fusión Fc.

La secuencia de bisagra puede incluir sustituciones que confieren propiedades farmacocinéticas, biofísicas y/o biológicas deseables. Una región bisagra ilustrativa para su uso en la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la siguiente: EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4).

El dominio Fc y la región bisagra pueden proceder de una clase o subclase de anticuerpos. Por ejemplo, la región de bisagra y el dominio Fc pueden proceder de IgG1. El dominio Fc y la región bisagra pueden corresponder a diferentes clases o subclases de anticuerpos. Por ejemplo, el dominio Fc puede corresponder a la región Fc de IgG2 o IgG4 y la región bisagra puede corresponder a IgG1.

Preferentemente, todos los dominios de inmunoglobulina de las proteínas de fusión Fc monocatenarias de la invención proceden de IgG1, preferentemente, IgG1 humana. Preferentemente, la región bisagra y la región Fc combinadas de las proteínas de fusión de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a: EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 5). Preferentemente, la región bisagra y la región Fc combinadas de las proteínas de fusión de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPQV
KFNWYVDGVQVHNAKTKPREQQYNSTYRVVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
SLSPGK (SEQ ID NO: 6).

Puede ser deseable tener una secuencia de bisagra y/o región Fc de las proteínas de fusión monocatenarias de la invención que comprendan un resto de cisteína libre para permitir la formación de un enlace disulfuro entre las regiones bisagra y/o Fc formando de este modo dímeros de las proteínas de fusión Fc de la invención. Puede ser deseable alterar las secuencias de la región bisagra y/o Fc para eliminar restos de cisteína libres, p. ej., mutando uno o más restos de cisteína en un conector a otro resto, tal como una serina, alanina o glicina. La región bisagra de las proteínas de fusión monocatenarias de la invención puede comprender uno o más restos de cisteína libres capaces de formar uno o más enlaces disulfuro con una segunda proteína de fusión monocatenaria de la invención formando de este modo un complejo dimérico.

Las proteínas de fusión X-L1-BISAGRA-Fc descritas en el presente documento contienen una parte X que puede ser cualquier proteína soluble de interés o cualquier fragmento activo de la misma o cualquier derivado activo de la misma. Las proteínas solubles de interés (X) que se pueden fusionar con un armazón L1-BISAGRA-Fc monocatenario de acuerdo con la divulgación incluyen, pero sin limitación: proteínas o partes o fragmentos de las mismas que pueden

unirse o interactuar con una molécula, célula, complejo y/o tejido diana, incluyendo dichas dianas sustratos enzimáticos, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, compuestos de bajo peso molecular y fragmentos de los mismos.

Las proteínas de unión solubles de interés (X) desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, la siguiente lista de proteínas, así como derivados activos, fragmentos activos, subunidades, dominios, motivos y epítomos pertenecientes a la siguiente lista de proteínas: renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante tiroidea; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VII, factor VIIIc, factor IX, factor tisular (FT) y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada tras la activación, expresada y secretada de forma normal en linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; sustancia antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento tales como, por ejemplo, EGFR, VEGFR; interferones tales como interferón alfa (α-IFN), interferón beta (β-IFN) e interferón gamma (γ-IFN); proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como AFGF y PFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 o TGF-5; factor insulínico de crecimiento I y II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión a factor insulínico de crecimiento; proteínas CD tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD34, CD40, CD40L, CD52, CD63, CD64, CD80 y CD147; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), p. ej., interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35; antagonistas del receptor de interleucina tales como IL1Ra; TNFα, superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de la membrana de superficie; factor de aceleración de la descomposición; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura del SIDA, p. ej., gp120; proteínas transportadoras; receptores de direccionamiento; addressinas; proteínas reguladoras; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac 1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, ICAM-3 y VCAM, integrina α4/p7 e integrina Xv/p3 que incluyen una o subunidades de las mismas, subunidades de integrina alfa tales como CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, alfa7, alfa8, alfa9, alfaD, CD11a, CD11b, CD51, CD11c, CD41, alfaIIb, alfaIELb; subunidades beta de integrina tales como, CD29, CD18, CD61, CD104, beta5, beta6, beta7 y beta8; combinaciones de subunidades de integrina incluyendo, pero sin limitación, αVβ3, αVβ5 y α4β7; un miembro de una ruta de apoptosis; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor de mp1; CTLA-4; proteína C; un receptor de Eph tal como EphA2, EphA4, EphB2, etc.; un antígeno leucocitario humano (HLA) tal como HLA-DR; proteínas del complemento tales como receptor del complemento CR1, CIRq y otros factores del complemento tales como C3 y C5; un receptor de glucoproteína tal como Gplba, GPIIb/IIIa y CD200; receptores solubles tales como TNFR2.

La proteína soluble de interés (X) puede ser el factor IX, TNFR2 (también conocido como TNFRSF1B) o IL1Rα. La proteína soluble de interés (X) también puede ser IL-10, IL-2, IL-2Rα o fusiones del mismo, o IFNβ. La proteína soluble de interés X es IL-10, IL-2, IL-2Rα (o fusiones del mismo), IFNβ, factor IX, TNFR2 (también conocido como TNFRSF1B) o IL1Rα.

Preferentemente, la proteína de fusión tiene la estructura del homodímero mostrado en la fig. 1A donde X es el factor IX, TNF-R2 o IL-1Ra o cualquier fragmento activo o derivado del mismo de cualquiera de las proteínas anteriores. Preferentemente, la proteína de fusión tiene la estructura de los homodímeros mostrados en la fig. 1A donde X es IL-10, IL-2, IL-2Rα (o fusiones del mismo), o IFNβ o cualquier fragmento activo o derivado de cualquiera de las proteínas anteriores. Preferentemente, la proteína de fusión tiene la estructura del heterodímero mostrado en la fig. 1B donde X es el factor IX, TNF-R2 o IL-1Ra e Y es diferente de X y es el factor IX, TNF-R2 o IL-1Ra. Preferentemente, la proteína de fusión tiene la estructura del heterodímero mostrado en la fig. 1B donde X es IL-10, factor IX, TNFR, IL-2, IL-2Rα (o fusiones del mismo), IFNβ o IL-1Ra e Y es diferente de X y es IL-10, factor IX, TNF-R2, IL-2, IL-2Rα (o fusiones del mismo), IFNβ o IL-1Ra. También se describe una proteína de fusión con la estructura del homodímero mostrado en la fig. 1C donde X es el factor IX, TNF-R2 o IL-1Ra. Una proteína de fusión puede tener la estructura del homodímero mostrado en la fig. 1C donde X es IL-10, IL-2, IL-2Rα (o fusiones del mismo) o IFNβ. También se describe una proteína de fusión con la estructura del heterodímero mostrado en la fig. 1D donde X es el factor IX, TNF-R2 o IL-1Ra e Y es diferente de X y es el factor IX, TNF-R2 o IL-1Ra. Una proteína de fusión puede tener la estructura del heterodímero mostrado en la fig. 1D donde X es IL-10, factor IX, TNF-R2, IL-2, IL-2Rα (o fusiones del mismo), IFNβ o IL-1Ra e Y es diferente de X y es IL-10, factor IX, TNF-R2, IL-2, IL-2Rα (o fusiones del mismo), IFNβ o IL-1Ra.

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es el factor IX y una proteína de fusión monocatenaria de la invención que tiene la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

TVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEEKCSFEEAREVFENTERTT
 EFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCKNIKNGRC
 EQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPPFCGRVSVSQTSLTRAETVFPD
 VDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGG
 SIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKY
 NHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTG
 IISWGEECAMKGKYGITYTKVSRVNWIKETKLTGGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGESGGGGSGGGGSGGGGSGGG
 GSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSSDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP

REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 7).

5

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es TNFR2 y una proteína de fusión monocatenaria de la invención que tiene la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

10

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSC
 DSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKEGCR
 LCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGN
 ASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPSPPA
 EGSTGDGGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNRGESGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPQVKFNWYVDGVQVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQNWLD
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es IL1Ra y una proteína de fusión monocatenaria de la invención que tiene la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

5

RPSGRKSSKMQA FRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGP NVNLEEKIDVVPIEPHALF
 LGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITD LSEN RKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAA
 CPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDEGGGGSGGGGSRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGESGGGGSGGGGS
 GGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSSDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO: 9).

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es IFN β y una proteína de fusión monocatenaria de la invención que tiene la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

10

MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAA
 LTIYEMLQNI FAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRG
 KLMSSLHLKRY YGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FYFINRLTG YLRNGGGGS
 GGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGG
 GGGSGGGSGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 RVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK. (SEQ ID NO: 18).

Como se desvela en el presente documento, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc comprende una proteína que se ha modificado mediante permutación circular como se describe en la publicación internacional número WO 2013/184942. La permutación circular implica la unión de los extremos amino y carboxilo naturales de una proteína, en general con un conector, y la creación de nuevos extremos amino y carboxilo mediante la escisión en un nuevo sitio en la secuencia proteica, en general un bucle; de modo que la secuencia primaria de la proteína resultante se reordena, mientras que se conserva la estructura secundaria (y la actividad). Por tanto, la creación de los nuevos extremos puede proporcionar mejores localizaciones para la unión de un compañero de fusión en relación con los extremos naturales. La permutación circular de un ligando de proteína proporciona un medio mediante el cual se puede alterar una proteína para producir nuevos extremos carboxilo y amino sin disminuir la especificidad y la afinidad de unión del ligando de proteína alterado por su diana en relación con su forma natural. Además, los nuevos extremos se pueden mover preferentemente a una localización preferente para incorporar el ligando permutado circularmente en

15

20

un polipéptido de fusión, y demostrar mejor actividad en comparación con un polipéptido de fusión que contiene el ligando natural (no permutado circularmente).

Como se desvela en el presente documento, la proteína soluble X de fórmula X-L1-BISAGRA-Fc puede comprender una fusión de dos proteínas diferentes designadas como Q-R y en donde Q y R pueden fusionarse mediante un conector opcional L5. Q puede ser un ligando soluble que puede formar un complejo de señalización con un receptor asociado a membrana y R es el dominio extracelular de una cadena receptora del receptor asociado a membrana. Q-L5-R puede ser IL-2 o IL-2 permutada circularmente fusionada al dominio extracelular de IL-2R α mediante un conector opcional.

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es una fusión de IL-2/IL-2R α en donde la proteína monocaténaria comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

SKNFHLRPRDLISNINVIVELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGS
SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVLNLAQGSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK
SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKE RKTTEMQSPMQP
VDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKM
THGKTRWTQPQLICTGGGGGSGGGSRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19).

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es una fusión de IL-2/IL-2R α en donde la proteína monocaténaria comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTG
 GSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVLNLAQGSGGGSELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFR
 IKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQSPM

QPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYYQCVQGYRALHRGPAESVC
 KMTGKTRWTQPQLICTGGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVGGGGGSGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGECGGSGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK. (SEQ ID NO: 20).

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es IL-10 en donde la proteína monocatenaria comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

5

MYRMQLLSICIALSLALVTNSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFF
 QMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCAALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS
 LGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE
 AYMTMKIRNGGSGGGGSGGSGPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFF
 QMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCAALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS
 LGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE
 AYMTMKIRNGGSGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23).

Preferentemente, la proteína soluble X de la fórmula X-L1-BISAGRA-Fc es IL-10 en donde la proteína monocatenaria comprende una secuencia de aminoácidos que es 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFF
 QMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS
 LGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE
 AYMTMKIRNGGSGGGGSGGSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFF
 QMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS
 LGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE
 AYMTMKIRNGGSGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KRVGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGECGGSGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24).

Preferentemente, las proteínas de fusión X-L1-BISAGRA-Fc de la invención son complejos diméricos que comprenden dos proteínas de fusión X-L1-BISAGRA-Fc monoméricas monocatenarias de la invención unidas mediante un enlace disulfuro con la región bisagra o en la región Fc del otro monómero. Los complejos diméricos pueden ser homodiméricos (p. ej., ambas proteínas de fusión monoméricas son idénticas) o heterodiméricos (p. ej., la proteína de interés (X) puede ser diferente para cada proteína de fusión monomérica). Preferentemente, los complejos diméricos son homodímeros que forman de este modo un complejo homodimérico que proporciona una configuración de anticuerpo que se asemeja a la de un anticuerpo nativo.

Sin quedar limitado a teoría alguna, se cree que las proteínas de fusión homodiméricas de la invención aumentan la semivida debido a la presencia de una región Fc dimerizada que se parece más a la estructura del anticuerpo nativo en comparación con las proteínas de fusión Fc tradicionales. Se cree que una configuración de anticuerpo de dominio Fc más nativa permite mejor unión al receptor FcRn y, por lo tanto, aumenta la semivida en circulación del complejo dimérico X-L1-BISAGRA-Fc.

Otra propiedad mejorada asociada con los complejos diméricos X-L1-BISAGRA-Fc es que la bioactividad aumenta en comparación con las proteínas de fusión Fc tradicionales basadas en el uso del conector scCLCH1 que transmite flexibilidad para aliviar el impedimento estérico provocado por la dimerización a través del Fc en la región bisagra.

Producción recombinante de proteínas de fusión X-L1-BISAGRA-Fc

Se desvelan en el presente documento ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas de fusión Fc. El uso codónico puede seleccionarse para mejorar la expresión en una célula. Dicho uso codónico dependerá del tipo celular seleccionado. Se han desarrollado patrones de uso codónico especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como células de mamíferos, células vegetales, células de levadura y células de insecto. Véase, por ejemplo: Mayfield *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 (2): 438-442 (21 de enero de 2003); Sinclair *et al.*, Protein Expr. Purif., 26 (1): 96-105 (octubre de 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol., 12 (5): 446-449 (octubre de 2001); Makrides *et al.*, Microbiol Rev., 60 (3): 512-538 (septiembre de 1996); y Sharp *et al.*, Yeast, 7 (7): 657-678 (octubre de 1991).

Se describen técnicas generales para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) o Ausubel, F. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1987) y actualizaciones

periódicas. En general, el ADN que codifica el polipéptido está unido operativamente a elementos reguladores de la traducción o transcripción adecuados procedentes de genes de mamíferos, víricos o de insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Se incorpora adicionalmente la capacidad de replicar en un hospedador, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes.

Las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento pueden producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Una secuencia líder N-terminal ilustrativa para la producción de polipéptidos en un sistema de mamífero es MYRMQLLSICALSLALVTNS (SEQ ID NO: 10), que es eliminada por la célula hospedadora después de la expresión.

Para células huésped procariotas que no reconocen ni procesan una secuencia señal nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas o enterotoxina II termoestable.

Para la secreción de levadura, la secuencia señal nativa puede sustituirse por, p. ej., el líder de invertasa de levadura, un líder de factor (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en la patente de los Estados Unidos n.º 5.631.144. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamíferos, así como líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN de dichas regiones precursoras puede ligarse en el marco de lectura a ADN que codifica la proteína.

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedador e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido de 2 micrómetros es adecuado para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamíferos. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección normales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o traciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, p. ej., el gen que codifica D-alanina racemasa de bacilos.

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína desvelada en el presente documento, p. ej., una proteína de armazón basada en fibronectina. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tan. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica la proteína desvelada en el presente documento. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT (SEQ ID NO: 16), donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas es una secuencia AATAAA (SEQ ID NO: 17) que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, 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.

La transcripción a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero puede estar controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la

hepatitis B y más preferentemente virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, p. ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

5 La transcripción de un ADN que codifica proteínas desveladas en el presente documento por eucariotas superiores aumenta con frecuencia al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias
10 potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucarióticas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el
15 potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El
20 potenciador puede sufrir corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del péptido, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

25 Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (p. ej., de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanas o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente a partir de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no
30 traducida de ARNm que codifica la proteína desvelada en el presente documento. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

35 El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de marcador proteico que pueda ser útil para purificar la proteína. Los ejemplos de marcadores proteicos incluyen, pero sin limitación, un marcador de histidina, un marcador FLAG, un marcador myc, un marcador HA o un marcador GST. Se pueden encontrar vectores de clonación y expresión adecuados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamíferos en Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, Nueva York (1985)).

40 La construcción de expresión se introduce en la célula hospedadora utilizando un método adecuado para la célula hospedadora, como resultará evidente para un experto en la materia. Se conocen en la técnica diversos métodos para introducir ácidos nucleicos en células hospedadoras, incluyendo, pero sin limitación, electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (donde el vector es un agente infeccioso).

45 Las células hospedadoras adecuadas incluyen procariotas, levaduras, células de mamífero o células bacterianas. Las bacterias adecuadas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilo* spp. También se puede usar levadura, preferentemente de la especie de *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, para la producción de polipéptidos. También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para
50 expresar proteínas recombinantes. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son revisados por Luckow *et al.* (Bio/Technology, 6: 47 (1988)). Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen células endoteliales, células de riñón de mono COS-7, CV-1, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano, HeLa, 293, 293T y líneas celulares BHK. Los polipéptidos purificados se preparan cultivando sistemas de hospedador/vector adecuados para
55 expresar las proteínas recombinantes. Para muchas aplicaciones, el pequeño tamaño de muchos de los polipéptidos desvelados en el presente documento haría expresión en *E. coli* el método preferido de expresión. Después, la proteína se purifica a partir de medios de cultivo o extractos celulares.

60 Se describen en el presente documento células hospedadoras que contienen vectores que codifican las proteínas de fusión Fc, así como métodos para producir las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento. Las células hospedadoras se pueden transformar con los vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para la producción de proteínas y se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias
65 deseadas. Las células hospedadoras útiles para la producción de proteínas de alto rendimiento (HTPP) y la producción a escala media incluyen la cepa bacteriana HMS 174. Las células hospedadoras utilizadas para producir las proteínas desveladas en el presente documento se pueden cultivar en diversos medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, muchos de los medios descritos en diversas publicaciones científicas se pueden utilizar como medios de cultivo para las células
70 hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía
75 equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones adecuadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares,

son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

- 5 Las proteínas de fusión Fc proporcionadas en el presente documento también se pueden producir utilizando sistemas de traducción celular. Para dichos fines, los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión deben modificarse para permitir transcripción *in vitro* para producir ARNm y permitir la traducción sin células del ARNm en el sistema sin células particular que se está utilizando (eucariotas tales como un sistema de traducción sin células de mamíferos o levadura o procariotas tales como un sistema de traducción sin células bacterianas).
- 10 Las proteínas de fusión Fc desveladas en el presente documento también se pueden producir mediante síntesis química (p. ej., mediante los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)). También pueden producirse modificaciones de las proteínas de fusión Fc mediante síntesis química.
- 15 Las proteínas de fusión Fc desveladas en el presente documento pueden purificarse mediante métodos de aislamiento/purificación de proteínas conocidas en general en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, precipitación por adición de sales (p. ej., con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución a contracorriente o cualquier combinación de estas. Después de la purificación, los polipéptidos pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, filtración y diálisis.
- 20 La proteína de fusión Fc purificada es preferentemente al menos 85 % pura o preferentemente al menos 95 % pura, y lo más preferentemente al menos 98 % pura. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, la proteína de fusión Fc es suficientemente pura para su uso como producto farmacéutico.
- 25

Usos de las proteínas de fusión X-L1-BISAGRA-Fc

- 30 Las proteínas de fusión Fc desveladas en el presente documento pueden ser útiles como agentes de diagnóstico o terapéuticos. Las proteínas de fusión Fc desveladas en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos. Las enfermedades o los trastornos que pueden tratarse estarán dictados por la identidad de la proteína (X) fusionada con el dominio Fc a través del conector L1 para su uso en la invención e incluyen, pero sin limitación: cáncer, enfermedades inflamatorias, artritis, osteoporosis, infecciones, en particular, hepatitis, infecciones bacterianas,
- 35 infecciones víricas, enfermedades genéticas, enfermedades pulmonares, diabetes, enfermedad relacionada con las hormonas, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardíacas, infarto de miocardio, trombosis venosa profunda, enfermedades del sistema circulatorio, hipertensión, hipotensión, alergias, alivio del dolor, enanismo y otros trastornos del crecimiento, intoxicaciones, enfermedades de la coagulación sanguínea, enfermedades del sistema inmunitario innato, embolia, cicatrización de heridas, curación de quemaduras, enfermedad de Crohn, asma, úlcera, septicemia,
- 40 glaucoma, isquemia cerebrovascular, síndrome de dificultad respiratoria, úlceras corneales, enfermedad renal, úlcera del pie diabético, anemia, deficiencia del factor IX, deficiencia del factor VIII, deficiencia del factor VII, mucositis, disfagia, trastorno de trombocitos, embolia pulmonar, esterilidad, hipogonadismo, leucopenia, neutropenia, endometriosis, enfermedad de Gaucher, obesidad, enfermedad del almacenamiento lisosómico, SIDA, síndrome premenstrual, síndrome de Turner, caquexia, distrofia muscular, enfermedad de Huntington, colitis, SARS, sarcoma de Kaposi, tumor de hígado, tumor de mama, glioma, linfoma no hodgkiniano, leucemia mielocítica crónica; tricoleucemia; carcinoma de células renales; tumor de hígado; linfoma; melanoma, esclerosis múltiple, sarcoma de Kaposi, virus del papiloma, enfisema, bronquitis, enfermedad periodontal, demencia, parto, cáncer de pulmón no microcítico, tumor de páncreas, tumor de próstata, acromegalia, psoriasis, tumor de ovario, enfermedad de Fabry, enfermedad del almacenamiento lisosómico.
- 45

- 50 Las proteínas solubles (X) terapéuticas ilustrativas que pueden unirse a un dominio Fc incluyen, por ejemplo, factor IX, IL1Ra y TNFR. Las proteínas solubles (X) terapéuticas ilustrativas que pueden unirse a un dominio Fc incluyen, por ejemplo, IL-10, IL-2, IL-2Rα o fusiones del mismo, o IFNβ. Las proteínas solubles (X) terapéuticas ilustrativas que pueden unirse a un dominio Fc incluyen, por ejemplo, IL-10, IL-2, IL-2Rα o fusiones del mismo, IFNβ, factor IX, IL1Ra y TNFR2.
- 55

- En el presente documento se desvela un método para lograr un efecto beneficioso en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una proteína de fusión. La cantidad eficaz puede producir un efecto beneficioso para ayudar a tratar una enfermedad o un trastorno. En algunos casos, el método para lograr un efecto beneficioso puede incluir administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de proteína de fusión para tratar a un sujeto por enfermedades y categorías de enfermedades en donde no existe una proteína o un péptido terapéutico.
- 60

- Se desvela en el presente documento una proteína de fusión X-L1-BISAGRA-Fc en donde X puede ser factor IX. Se desvela en el presente documento un complejo dimérico de X-L1-BISAGRA-Fc en donde X puede ser factor IX. El complejo dimérico desvelado en el presente documento puede ser un complejo homodimérico. Se pueden utilizar
- 65

proteínas de fusión del factor IX para tratar a pacientes que tienen deficiencia de factor IX y padecen hemofilia B para, p. ej., control y prevención de episodios hemorrágicos, profilaxis rutinaria para prevenir o reducir la frecuencia de episodios hemorrágicos y tratamiento perioperatorio (profilaxis quirúrgica).

5 Un paciente que necesita control o prevención de hemorragia o episodios hemorrágicos es preferentemente un paciente humano. El paciente puede estar sangrando en el momento de la administración o se puede esperar que
10 esté sangrando, o puede ser susceptible a sangrar en una hemorragia menor, hemartrosis, hemorragia muscular superficial, hemorragia de tejidos blandos, hemorragia moderada, hemorragia intramuscular o de tejidos blandos con disección, hemorragia de la membrana mucosa, hematuria, hemorragia mayor, hemorragia de la faringe, hemorragia
15 de la retrofaringe, hemorragia del retroperitoneo, hemorragia del sistema nervioso central, hematomas, cortes, raspaduras, hemorragia articular, hemorragia nasal, hemorragia bucal, hemorragia gingival, hemorragia intracraneal, hemorragia intraperitoneal, hemorragia espontánea menor, hemorragia después de traumatismo mayor, hematomas moderados en la piel o hemorragia espontánea en las articulaciones, músculos, órganos internos o el cerebro. Dichos
20 pacientes también incluyen los que necesitan tratamiento perioperatorio, tal como tratamiento de la hemorragia asociada con la cirugía o la extracción dental. Preferentemente, el paciente necesita profilaxis de uno o más episodios hemorrágicos. Preferentemente, el paciente necesita profilaxis de intervalo individualizado. Preferentemente, el
25 paciente necesita profilaxis de tratamiento a demanda de uno o más episodios hemorrágicos. Preferentemente, el paciente necesita tratamiento perioperatorio de uno o más episodios hemorrágicos.

30 Cuando se trata la hemofilia con una proteína de fusión de la invención que comprende factor IX, una "dosis eficaz" reduce o disminuye la frecuencia de hemorragia o trastorno hemorrágico. Preferentemente, una "dosis eficaz" detiene hemorragia o episodios hemorrágicos en curso, incontrolables. Preferentemente, una "dosis eficaz" previene hemorragia o episodios hemorrágicos espontáneos en un sujeto susceptible a dicha hemorragia o episodios hemorrágicos espontáneos. No es necesario que una "dosis terapéutica" cure la hemofilia.

35 Se desvela en el presente documento una proteína de fusión X-L1-BISAGRA-Fc en donde X puede ser IL-10. Se desvela en el presente documento un complejo dimerizado de X-L1-BISAGRA-Fc en donde X puede ser IL-10. El complejo dimerizado desvelado en el presente documento puede ser un complejo homodimerizado. Puede usarse una
40 proteína de fusión de IL-10 y/o un complejo dimerizado de la misma para tratar a pacientes que padecen, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios, enfermedades fibróticas, enfermedades inflamatorias, enfermedades isquémicas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuropáticas, trastornos del dolor, trastornos auditivos, trastornos psiquiátricos, cáncer y traumatismo y lesión.

45 Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: encefalomiелitis diseminada aguda (EMDA), leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, espondilitis anquilosante, nefritis anti-MBG/anti-MBT, síndrome antifosfolípido (SAP), angioedema autoinmunitario, anemia aplásica autoinmunitaria, disautonomía autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, hiperlipidemia autoinmunitaria, inmunodeficiencia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), síndrome
50 linfoproliferativo autoinmunitario (SLPA), miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, pancreatitis autoinmunitaria, retinopatía autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (PTA), tiroiditis autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, neuropatías axónicas o neuronales, enfermedad de Balo, enfermedad de Behcet, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad de celíaca, enfermedad de Chagas, síndrome de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), osteomielitis multifocal recidivante crónica (OMRC),
55 penfigoide cicatricial/penfigoide mucoso benigno, síndrome de Cogan, enfermedad de las aglutininas frías, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis de Coxsackie, enfermedad CREST, enfermedad de Crohn, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, esofagitis eosinofílica, fascitis eosinofílica, eritema nodoso, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evans, encefalomiелitis alérgica experimental, fibromialgia, alveolitis fibrosante, arteritis
60 de células gigantes (arteritis temporal), miocarditis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulomatosis con poliangitis (GPA) (anteriormente denominada granulomatosis de Wegener), enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, lipoproteínas
65 inmunorreguladoras, miositis por cuerpos de inclusión, cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil (diabetes de tipo 1), miositis juvenil, enfermedad de Kawasaki, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis lefosa, enfermedad de IgA lineal (EAL), lupus (lupus eritematoso sistémico), enfermedad de Lyme, crónica, enfermedad de Meniere, poliangitis microscópica, enfermedad del tejido conectivo mixto (ETCM), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple (EM), miastenia grave, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, reumatismo palindrómico, PANDAS (trastornos neuropsiquiátricos pediátricos autoinmunitarios asociados a *Streptococcus*), hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), síndrome de Parry Romberg, pars planitis (uveítis periférica), síndrome de Parsonage-Turner, pénfigo, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia
70 perniciosa, síndrome POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome postinfarto de miocardio, síndrome postpericardiotomía, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, dermatitis por progesterona, psoriasis, artritis psoriásica, aplasia pura de la serie roja, piodermia gangrenosa, fenómeno de Raynaud,

artritis reactiva, distrofia simpática refleja, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, síndrome de las piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, fiebre reumática, artritis reumatoide (AR), artritis reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, autoinmunidad de espermatozoides y testicular, síndrome de la persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda, síndrome de Susac, oftalmia simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, diabetes de tipo 1, síndromes poliglandulares autoinmunitarios de tipo I, II, y III, colitis ulcerosa, enfermedad del tejido conectivo indiferenciado (ETCI), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculoampollosa, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

Los ejemplos de enfermedades fibróticas que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: capsulitis adhesiva, artrofibrosis, fibrosis auricular, enfermedad renal crónica, cirrosis hepática, fibrosis quística (FQ), contractura de Dupuytren, fibrosis endomiocárdica, cicatriz glial, fibrosis pulmonar idiopática, queloide, degeneración macular, fibrosis del mediastino, mielofibrosis, esteatosis hepática no alcohólica/esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis sistémica nefrótica, enfermedad de Peyronie, fibrosis masiva progresiva (pulmones), vitrorretinopatía proliferativa, fibrosis pulmonar, fibrosis retroperitoneal, formación de tejido cicatricial resultante de ictus, esclerodermia, esclerosis sistémica, adhesión tisular.

Los ejemplos de enfermedades inflamatorias que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: enteritis alérgica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, espondilitis anquilosante, asma, esófago de Barrett, enfermedad de Behcet, síndrome de fatiga crónica (SFC/SDIFC/EM), enfermedad de Lyme crónica (borreliosis), vasculitis asociada a cocaína, enfermedad de Crohn, deficiencia del antagonista del receptor de interleucina-1 (DIRA), depresión, diabetes, fiebre mediterránea familiar (FMF), fibromialgia (FM), enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), glomerulonefritis, enfermedad del injerto contra el hospedador, angitis granulomatosa, tiroiditis de Hashimoto, hipertensión, hipertiroidismo, hipotiroidismo, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), miopatías inflamatorias (polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, dermatomiositis), cistitis intersticial (CI), síndrome del intestino irritable (SII), colitis isquémica, cálculos renales, síndrome de Lofgren, lupus eritematoso, vasculitis asociada a metanfetamina, cefalea de tipo migraña, enfermedad de Morgellon, hipersensibilidad química múltiple (SQM), esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria multiorgánica de inicio neonatal (NOMID), neuritis óptica, artrosis, pénfigo vulgar, polimialgia reumática, prostatitis, psoriasis, artritis psoriásica, colitis por radiación, síndrome/fenómeno de Raynaud, artritis reactiva (síndrome de Reiter), distrofia simpática refleja (DSR), síndrome de las piernas inquietas, artritis reumatoide (AR), sarcoidosis, esclerodermia, trastorno afectivo estacional (TAE), choque séptico, sinusitis, síndrome de Sjögren, arteritis temporal, síndrome periódico asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAPS), colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis y vértigo.

Los ejemplos de enfermedades isquémicas que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: síndrome coronario agudo, angina de pecho, angina de pecho sin dolor, coceptina, arteriopatía coronaria, isquemia coronaria, miocardio hibernado, ictus isquémico, tratamiento del síndrome coronario agudo, meldonio, infarto de miocardio, complicaciones del infarto de miocardio, diagnóstico de infarto de miocardio, miocitólisis, encefalopatía postanóxica, angina de Prinzmetal, criterios de Sgarbossa, ictus, TIMI, ataque isquémico transitorio (AIT) y angina inestable.

Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: ataxia telangiectasia, ataxia cerebelosa autosómica dominante, síndrome de Baggio-Yoshinari, enfermedad de Batten, enfermedades de estrógenos y neurodegenerativas, neuropatía hereditaria motora y sensorial con predominio proximal, enfermedad de Refsum infantil, JUNQ y IPOD, ataxia locomotora, enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph, retraso mental y microcefalia con hipoplasia protuberancial y cerebelosa, atrofia multisistémica, neuroacantocitosis, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Niemann-Pick, hipoplasia pontocerebelosa, agregación de proteínas, deficiencia de piruvato deshidrogenasa, mielopatía por radiación, enfermedad de Refsum, retinitis pigmentosa, enfermedad de Sandhoff, síndrome de Shy-Drager, atrofia muscular espinal, ataxia espinocerebelar, degeneración combinada subaguda de la médula espinal, panencefalitis esclerosante subaguda, tabes dorsal, enfermedad de Tay-Sachs, encefalopatía tóxica, leucoencefalopatía tóxica y síndrome del erizo tambaleante.

Los ejemplos de enfermedades neuropáticas que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: parálisis de Bell, axonopatías motoras asociadas a campylobacter, Charcot-Marie-Tooth, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, avulsión amiotrófica diabética, neuropatías diabéticas, síndrome de Guillain Barre y vasculitis.

Los ejemplos de trastornos del dolor que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: Síndromes de dolor musculoesquelético amplificado, síndrome de compresión nerviosa cutánea anterior, síndrome de dolor central, dolor abdominal funcional crónico, dolor crónico, prostatitis crónica/síndrome de dolor pélvico crónico, dolor crónico de heridas, discopatía degenerativa, disfunción sensitivomotora dentomandibular, síndrome de lumbalgia postquirúrgica, fibromialgia, cistitis intersticial, síndrome del intestino irritable (SII), síndrome de dolor miofascial, dolor pélvico, síndrome de dolor postvasectomía, distrofia neurovascular refleja, anemia falciforme, teramina y vulvodinia.

Los ejemplos de trastornos auditivos que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: pérdida de audición conductiva, hipoacusia neurosensorial (SNHL), hipoacusia mixta.

5 Los ejemplos de trastornos psiquiátricos que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: trastorno depresivo mayor, depresión refractaria al tratamiento, depresión resistente al tratamiento.

10 Los ejemplos de traumatismo y lesión que pueden tratarse mediante las proteínas de fusión de IL-10 desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación: incluyendo lesiones del sistema nervioso central (SNC), lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, lesiones por aplastamiento, choque, daño de tendón, heridas en la córnea, heridas en el ojo, heridas cutáneas.

15 Un complejo dimerizado de IL-10 desvelado en el presente documento puede usarse para tratar pacientes que padecen, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios, incluyendo síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLPA), tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Kawasaki, lupus (lupus eritematoso sistémico), esclerosis múltiple (EM), miastenia grave, psoriasis, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, diabetes de tipo 1, colitis ulcerosa; enfermedades fibróticas, incluyendo enfermedad renal
20 crónica, cirrosis hepática, degeneración macular, esteatosis hepática no alcohólica/esteatohepatitis no alcohólica, vitrorretinopatía proliferativa, fibrosis pulmonar, formación de tejido cicatricial resultante de ictus, adhesión tisular; incluyendo enfermedades inflamatorias, incluyendo enteritis alérgica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, asma, enfermedad de Behcet, vasculitis asociada a cocaína, glomerulonefritis, enfermedad del injerto contra el hospedador, angitis granulomatosa, enfermedad inflamatoria intestinal, miopatías inflamatorias (polimiositis, miositis por cuerpos
25 de inclusión, dermatomiositis), colitis isquémica, vasculitis asociada a metanfetamina, neuritis óptica, pénfigo vulgar, colitis por radiación, sarcoidosis, choque séptico, arteritis temporal, vasculitis; enfermedades isquémicas, incluyendo infarto de miocardio, encefalopatía postanóxica, ictus; enfermedades neurodegenerativas, incluyendo lipofuscinosis ceroides neuronal, mielopatía por radiación, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal; enfermedades neuropáticas, incluyendo axonopatías motoras asociadas a Campylobacter, Charcot-Marie-Tooth, polineuropatía desmielinizante
30 inflamatoria crónica, avulsión amiotrófica diabética, neuropatías diabéticas, síndrome de Guillain-Barre; trastornos auditivos incluyendo pérdida auditiva conductiva, hipoacusia neurosensorial (SNHL), hipoacusia mixta; trastornos psiquiátricos, incluyendo trastorno depresivo mayor, depresión refractaria al tratamiento, depresión resistente al tratamiento; traumatismo y lesión, incluyendo lesiones del sistema nervioso central (SNC), lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, lesiones por aplastamiento, choque, daño de tendón, heridas en la córnea, heridas en el
35 ojo, heridas cutáneas.

Una proteína de fusión de IL-10 o un complejo dimerizado de la misma desvelado en el presente documento puede usarse para tratar pacientes que padecen, por ejemplo, cáncer de útero, cuello del útero, mama, ovarios, próstata, testículos, pene, tracto gastrointestinal, esófago, orofaringe, estómago, intestino delgado o grueso, colon o recto, riñón,
40 célula renal, vejiga, hueso, médula ósea, piel, cabeza o cuello, piel, hígado, vesícula biliar, corazón, pulmón, páncreas, glándula salival, glándula suprarrenal, tiroides, cerebro, gliomas, ganglios, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), y sistema inmunitario, bazo o timo, cánceres inducidos por el virus del papiloma, cánceres de células epiteliales, cánceres de células endoteliales, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas, melanomas, sarcomas, teratocarcinomas, tumores inmunógenos, tumores no inmunógenos, tumores
45 inactivos, linfomas, leucemias, mielomas, cánceres inducidos químicamente, metástasis y angiogénesis y esclerosis tuberosa.

Una proteína de fusión de IL-10 o un complejo dimerizado de la misma desvelado en el presente documento puede usarse para tratar pacientes que padecen trastornos auditivos, carcinoma de células renales, melanoma, psoriasis,
50 fibrosis, depresión y enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Se desvelan en el presente documento proteínas de fusión Fc para su uso como medicamento. Además, se desvela en el presente documento una proteína de fusión X-L1-BISAGRA-Fc en donde X es una proteína soluble de interés como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento. X puede ser factor IX, IL1Ra o TNFR. X puede ser
55 IL-10, IL-2, IL-2R α (o fusiones del mismo) o IFN β para su uso como medicamento. Se desvela en el presente documento un complejo dimérico de X-L1-BISAGRA-Fc en donde X es una proteína soluble de interés como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento.

Se desvelan en el presente documento proteínas de fusión Fc para su uso como medicamento tratar una enfermedad. Además, se desvela en el presente documento una proteína de fusión X-L1-BISAGRA-Fc en donde X es una proteína soluble de interés como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento para tratar enfermedades como se ha descrito anteriormente. X puede ser factor IX, para su uso como medicamento para tratar hemorragias. X puede ser IL-10 para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (EC), artritis reumatoide (AR), psoriasis, infecciones víricas tales como hepatitis C crónica y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
60

65 Se desvela en el presente documento un complejo dimérico de X-L1-BISAGRA-Fc en donde X es una proteína soluble

de interés como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento tratar una enfermedad. X puede ser factor IX, IL1Ra o TNFR, para su uso como medicamento para tratar el cáncer, enfermedades autoinmunitarias y trastornos hemorrágicos. X puede ser IL-10, IL-2, IL-2Rα o fusiones del mismo, o IFNβ para su uso en el tratamiento de, por ejemplo, trastornos auditivos, carcinoma de células renales, melanoma, psoriasis, fibrosis, depresión y enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Un complejo de proteína de fusión dimerizada con factor IX desvelado en el presente documento también se puede usar en la fabricación de un medicamento para tratar pacientes que tienen deficiencia de factor IX y padecen hemofilia B para, p. ej., control y prevención de episodios hemorrágicos, profilaxis rutinaria para prevenir o reducir la frecuencia de episodios hemorrágicos y tratamiento perioperatorio (profilaxis quirúrgica).

Una proteína de fusión de IL-10 o complejo dimerizado de la misma desvelado en el presente documento también se puede usar en la fabricación de un medicamento para tratar a pacientes con enfermedades como se ha expuesto anteriormente, trastornos auditivos, trastornos auditivos, carcinoma de células renales, melanoma, psoriasis, fibrosis, depresión y enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

La solicitud proporciona además composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento. Se preparan formulaciones terapéuticas que comprenden proteínas de fusión Fc para almacenamiento mezclando las proteínas descritas que tienen el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables ("Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras desecadas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones del presente documento también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Las proteínas de fusión Fc también se pueden inmovilizar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen las proteínas de armazón basadas en fibronectina descritas en el presente documento, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas, copolímeros de lactida y glicólido, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etilvinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables. Mientras polímeros tales como etilvinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación sostenida de, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden desarrollar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, se puede lograr estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Aunque el experto en la materia comprenderá que la dosis de cada proteína de fusión Fc dependerá de la identidad

de la proteína soluble (X), la dosis varía entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1-30 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, administrándose la proteína usando una de las siguientes pautas posológicas: cada cuatro semanas para seis dosis, después cada tres meses; cada tres semanas; 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. Se puede administrar una proteína de fusión en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique midiendo los niveles en sangre de la proteína soluble en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración en plasma de proteína soluble de aproximadamente 0,1-1000 pg/ml y en algunos métodos aproximadamente 5-300 mg/ml.

En aplicaciones terapéuticas, las proteínas de fusión Fc se administran a un sujeto, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar por vía intravenosa como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, subcutánea, intraocular, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. La proteína también se puede administrar por vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y los expertos en la técnica pueden determinarlos según lo requiera la situación clínica. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene de aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) solución salina al 0,9 % (NaCl al 0,9 % p/v) y (3) dextrosa al 5 % (p/v). Los métodos desvelados en el presente documento se pueden practicar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

La administración de proteínas de fusión Fc y uno o más agentes terapéuticos adicionales, ya sea coadministrados o administrados secuencialmente, se puede producir como se ha descrito anteriormente para aplicaciones terapéuticas. El experto en la materia entenderá que los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la coadministración dependen de la identidad del agente terapéutico particular que se coadministra.

Cuando está presente en forma de dosificación acuosa, en lugar de estar liofilizada, la proteína de fusión Fc se formulará normalmente a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una amplia variación fuera de estos intervalos. Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada de proteínas de fusión Fc dependerá del tipo de enfermedad para tratar, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si las proteínas de fusión Fc se administran con fines preventivos o terapéuticos, del ciclo de terapia anterior, del historial clínico del paciente y de la respuesta a la proteína de fusión Fc y del criterio del médico tratante. La proteína de fusión Fc se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Factor IX

Diseño de factor IX scCLCH1-Fc

La molécula del factor IX monocatenario contiene la secuencia del factor IX seguida de un conector de 10 restos que tiene la secuencia de aminoácidos: GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11), el dominio CL de IgG1 seguido de un conector de 20 restos que tiene la secuencia de aminoácidos: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12) seguido de las partes CH1, bisagra y Fc de IgG1 humana.

Expresión y caracterización del factor IX scCLCH1-Fc

El gen, que tiene la siguiente secuencia de ADN:

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTCGTGACCA
 ACAGCACCGTGTCTTCTGGACCACGAGAACGCCAACAAAGATCCTGAACCGGCCCA
 AGCGGTACAACAGCGGCAAGCTGGAAGAGTTCGTGCAGGGCAACCTGGAACGCG
 AGTGCATGGAAGAGAAGTGCAGCTTCGAAGAGGCCAGAGAGGTGTTGAGAAC
 ACCGAGCGGACCACCGAGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACGGCGACCAGTGCGAG
 AGCAACCCCTGTCTGAATGGCGGCAGCTGCAAGGACGACATCAACAGCTACGAG
 TGCTGGTGCCCTTCGGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTGGACGTGACCTGCA
 ACATCAAGAACGGCAGATGCGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAAG
 GTCGTGTGCTCCTGCACCGAGGGCTACAGACTGGCCGAGAACCAGAAGTCCTGC
 GAGCCCGCCGTGCCTTTCCCATGTGGAAGAGTGTCCGTGTCCAGACCAGCAAGC
 TGACCAGAGCCGAGACAGTGTTCGCCGACGTGGACTACGTGAACTCCACCGAGG
 CCGAGACAATCCTGGACAACATCACCCAGAGCACCCAGTCCTTCAACGACTTCAC
 CAGAGTCGTGGCGGGCGAGGATGCCAAGCCTGGACAGTTCCTCGTGCCAGGTGGT
 GCTGAACGGAAGGTGGACGCCCTTTTGGCGGGCAGCATCGTGAACGAGAAGTG
 GATCGTGACAGCCGCCACTGCGTGGAACCGGCGTGAAGATTACAGTGGTGGC
 CGGCGAGCACAACTCAGGAAACCGAGCACACAGAGCAGAAACGGAACGTGA
 TCAGAAATCATCCCCACCACAACCTACAACGCCGCCATCAACAAGTACAACCACG
 ACATTGCCCTGTGGAAGTGGACGAGCCCCCTGGTGCTGAATAGCTACGTGACCCC
 CATCTGCATTGCCGACAAAGAGTACACCAACATCTTTCTGAAGTTCGGCAGCGGC
 TACGTGTCCGGCTGGGGCAGAGTGTTTCACAAGGGCAGATCCGCTCTGGTGCTGC
 AGTACCTGAGAGTGCCTCTGGTGGACCGGGCCACCTGTCTGAGAAGCACCAGT
 TCACCATCTACAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCATGAGGGCGGCAGAGATAG
 CTGTCAGGGCGATTCTGGCGGCCCTCACGTGACAGAAGTGGAAGGCACCAGCTT
 TCTGACCGGCATCATCAGCTGGGGCGAGGAATGCGCCATGAAGGGGAAGTACGG
 CATCTACACCAAGGTGTCCAGATATGTGAACTGGATCAAAGAAAAGACCAAGCT
 GACAGGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCTAGAACAGTGGCCGCTCCAG
 CGTGTTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTC
 GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG
 GACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAG
 CAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA
 CGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCC
 AGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATCTGGGGGCGGAGGATCAGGCGGGG
 GAGGAAGTGGGGGAGGGGGAAGCGGAGGGGGAGGATCTGCCTCTACAAAGGGC
 CCTAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTAGCAGCAAGTCTACAAGCGGAGGCACAGCTG
 CCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAA
 CAGCGGAGCACTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAG
 CGGCCTGTACTCTGTGAGCAGCGTGTGACAGTGCCAGCAGCTCTCTGGGCACC
 CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAATACCAAAGTGGACAAG
 CGGGTGAACCCAAAGAGCAGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCC
 CCCGAAGTGTGGGAGGCCCTTCCGTGTTCTGTCCCCCCTTGAAGCCCAAGGACA
 CCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCA
 CGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTATGTGGACGGGTGGAAGTGACACAA
 CGCCAAGACCAAACCCAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACCGGGTGGTGTG
 CGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGTATAAGTGCAA
 AGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA
 GGGCCAGCCCCGCGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCAAGCCGGGAAGAGAT
 GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCTTCCGAT
 ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAAACATTACAAGACCACC
 CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAACTGACCGTGG
 ACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGG

CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG (SEQ ID NO: 13); se sintetizó
 5 (Genewiz), se clonó en pcDNA/UCOE y se expresó transitoriamente en células HEK293 usando el sistema de
 expresión Expi293 (Life Technologies). Las proteínas se purificaron primero usando proteína A (GE Healthcare) con
 elución de pH bajo y se dializaron frente a 2 l de TRIS 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM 3 veces. Después de la diálisis,
 la proteína se cargó en una columna de Q sepharose FF y se eluyó con gradientes escalonados de CaCl₂ en TRIS
 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. Las fracciones más activas se agruparon y dializaron frente a PBS 1X para análisis
 10 adicionales.

La molécula se analizó mediante gel SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (fig. 2). Para condiciones no reductoras, se cargaron 5 µg de proteína purificada en un gel de TRIS-acetato al 3-8 % NuPAGE® NOVEX® (Invitrogen) con un patrón de proteína preteñido HIMARK™ (Invitrogen) (intervalo de PM 31 kD - 460 kD). Para condiciones reductoras, se cargaron 5 µg de proteína en un gel Any kD™ (Invitrogen) con un patrón Kaleidoscope PRECISION PLUS PROTEIN™ (Invitrogen) (intervalo de PM 10 kD - 250 kD).

Bioactividad del factor IX scC_LCH1-Fc (ensayo APTT)

Se realizó un ensayo automatizado de actividad del factor IX utilizando el instrumento KC-1 Delta™ (Tcoag, Wicklow, IRE) para cuantificar la capacidad del componente FIX del factor IX scC_LCH1-proteína Fc para restaurar la actividad de coagulación del plasma deficiente en FIX. Las muestras de prueba se mezclaron con volúmenes iguales de plasma humano deficiente en FIX (George King BioMedical Inc, Overland Park, KS) y activador de ácido elálgico que contiene cefalina (aPTT-activador soluble, Helena Laboratories, cat. n.º 5389) y después de 4 min de incubación, se añadió cloruro de calcio 5 mM (reserva 25 mM, VWR) y se midió el tiempo de coagulación. La actividad se calculó en función de una curva de calibración de tiempos de coagulación frente a la concentración de la unidad de actividad (UI/ml) de diluciones en serie del patrón rHuman Factor IX (FIX) (Haematologic Technologies Inc. Essex Junction, VT) para proteínas purificadas. Los factores de los sistemas de coagulación intrínsecos se activan incubando el plasma con la cantidad óptima de fosfolípidos y un activador de superficie a 37 °C. La adición de iones de calcio desencadena el proceso de coagulación y después se mide el tiempo de coagulación. El APTT es el tiempo necesario para que se forme un coágulo de fibrina (fig. 3).

PK de rata del factor IX scC_LCH1-Fc

Se administraron dosis intravenosas individuales de 51 UI/kg de factor IX scC_LCH1-Fc en la vena lateral de la cola de 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre a las 0,25, 4, 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración del factor IX scC_LCH1-Fc y plasma citratado (0,32 % final). Las concentraciones se midieron utilizando técnicas convencionales de MSD con IgG de cabra purificada por afinidad anti-factor IX humano (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN) como anticuerpo de captura y el anticuerpo de cabra anti-IgG Fc humano de adsorción cruzada biotinilado (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) como anticuerpo de detección. Se realizó análisis farmacocinético utilizando modelado no compartimental con el programa informático WINNONLIN® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos derivadas de los datos de MSD incluyeron la concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva de tiempo frente a concentración (ABC) y semivida de eliminación (t_{1/2}) (fig. 4 y tabla 1).

Tabla 1

Artículo de prueba	Animal de ensayo	Vía de dosificación	Dosis	Dosis	C _{máx}	ABC _{0-∞}	t _{1/2}
			(mg/kg)	(UI/kg)	(µg/ml)	(µg-h/ml)	(h)
FIXscLCLCH1Fc	rata	IV	7,9	51	17,0 ± 11,4	69,6 ± 7,78	53,7 ± 12,5
Mono* FIXFc rhFIX**	rata	IV		200			34,8 ± 5,3
	rata	IV		50	2,6	8,2	5,0

* Peters, R. T. *et al.* Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. Blood. (2013).
 **Keith, J.C. *et al.* Evaluation of Recombinant Human Factor IX: Pharmacokinetic Studies in the Rat and the Dog. Thrombosis and Haemostasis 73 (1): 101-105 (1994).

Ejemplo 2: TNF-R2

Diseño de TNF-R2 scC_LCH1-Fc

La molécula de TNFR2 monocatenaria contiene la secuencia de TNFR2 seguida de un conector de 10 restos, GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11), el dominio CL de IgG1 seguido de un conector de 20 restos GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12) seguido de las partes CH1, bisagra y Fc de IgG1 humana.

Expresión de TNF-R2 scC_LCH1-Fc

El gen, que tiene la siguiente secuencia de ADN:

ATGTATAGGATGCAGCTCCTCAGCTGCATCGCTCTGTCCCTCGCCCTGGTGACCA
 ACAGCCTCCCTGCCCAGGTGGCCTTTACACCCTACGCTCCTGAGCCCGGAAGCAC
 CTGCAGGCTCAGGGAGTACTACGATCAGACCGCCCAAATGTGTTGCAGCAAGTG
 CTCCCCTGGCCAGCACGCCAAGGTGTTCTGCACCAAGACAAGCGATACCGTGTGC
 GATAGCTGTGAGGACAGCACCTACACCCAGCTGTGGAATTGGGTGCCCGAGTGC
 CTGAGCTGTGGCAGCAGGTGCAGCAGCGATCAGGTGGAGACACAGGCCTGCACC
 AGAGAGCAGAACAGGATTTGTACCTGCAGGCCCGGCTGGTATTGCGCCCTGAGC
 AAGCAGGAGGGATGTAGGCTGTGCGCCCTCTGAGGAAATGCAGACCTGGCTTT
 GGAGTGGCTAGGCCCGGCACCGAGACATCCGACGTGGTGTGCAAGCCTTGTGCC
 CCTGGCACCTTTTCCAACACCACCAGCTCCACCGACATCTGCAGGCCCCATCAGA
 TTTGCAACGTGGTGGCCATCCCCGAAACGCTAGCATGGATGCCGTGTGCACCTC
 CACCTCCCCTACCAGGAGCATGGCCCTGGAGCCGTGCATCTGCCTCAACCCGTC
 AGCACCAGAAGCCAGCACACACAGCCCAACCCCGAACCTAGCACCGCTCCCTCC
 ACCAGCTTCCTGCTGCCTATGGGACCCTCCCCTCCTGCCGAAGGGAGCACCGGAG
 ATGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGAGGCTCCAGAACAGTGGCTGCCCTAGC
 GTGTTCAATTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTCAAGTCCGGAACCGCTTCCGTGG

TCTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTCG
 ACAATGCTCTGCAGAGCGGAACTCCCAGGAGTCCGTCACCGAGCAGGACAGCA
 AGGACTCCACATATAGCCTGTCTCCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTATGA
 GAAACACAAGGTGTATGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGT
 CACCAAGTCCTTCAATAGGGGCGAGAGCGGAGGGCGGGAGCGGGCGGGCGGCG
 GGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGCGAGGAGGCGGAAGCGCTTCCACCAAGGGACCT
 AGCGTGTTTTCCCTCGCCCCAGCTCCAAGAGCACAAAGCGAGGCACAGCCGCT
 CTGGGCTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCCGAGCCCGTCACAGTGAGCTGGAAT
 CCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCACACCTTTCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG
 ACTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTACAGTGCCCTCCAGCTCCCTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACAAAGGTGGACAAGAGA
 GTGGAACCTAAGTCCTGTGACAAAACCCATACCTGCCCTCCCTGCCCTGCCCTG
 AGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTGTTTCCCCCAACCCAAGGATACCCT
 GATGATCAGCAGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGA
 GGACCCTCAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCCAGGTGCACAATGCT
 AAGACCAAGCCCAGGGAGCAGCAATACAATTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG
 CTCACCGTCTCCACCAGAAGTGGCTCGACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTG
 AGCAACAAGGCTCTCCCCGCCCTATCGAGAAGACCATTTCCAAAGCCAAGGGC
 CAGCCCAGAGAACCTCAAGTCTACACCCTGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTCGTCAAGGGATTCTATCCAGCGACATC
 GCCGTGGAATGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACACC
 CCCGTGCTGGATTCCGATGGCAGCTTTTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGATA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCTCCGTATGCACGAAGCCC TGCACAATCACTACACCCA-

5 GAAGAGCCTGTCCCTCAGCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 14); se sintetizó (Genewiz), se clonó en pcDNA/UCOE y se expresó transitoriamente en células HEK293 usando el sistema de expresión Expi293 (Life Technologies). Las proteínas se purificaron primero usando proteína A (GE Healthcare) con elución de pH bajo y se dializaron frente a 2 l de PBS 1X 3 veces.

10 La molécula se analizó mediante gel SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (fig. 5A y 5B). Para condiciones no reductoras, se cargaron 5 µg de proteína purificada en un gel de TRIS-acetato al 3-8 % NuPAGE® NOVEX® (Invitrogen) con un patrón de proteína preteñido HIMARK™ (Invitrogen) (intervalo de PM 31 kD - 460 kD). Para condiciones reductoras, se cargaron 5 µg de proteína en un gel Any kD™ (Invitrogen) con un patrón Kaleidoscope PRECISION PLUS PROTEIN™ (Invitrogen) (intervalo de PM 10 kD - 250 kD).

15 Bioactividad de TNF-R2 scC_LCH1-Fc

20 Las células TNF-α HEK-Blue™ (InvivoGen) son células renales embrionarias humanas diseñadas específicamente para detectar TNF-α bioactivo *in vitro* supervisando la activación de las rutas NF-κB/AP-1. La línea celular expresa un gen indicador inducible de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) bajo el control del promotor mínimo de IFN-β fusionado con cinco sitios de unión NFκB y cinco AP-1. Para el ensayo de antagonista de TNF-α, se sembraron en placas células TNF-α HEK-Blue a 50.000 células/pocillo en medio DMEM que contenía L-glutamina 2 mM, glucosa 4,5 g/l y FBS termoinactivado al 10 % (Gibco) y TNF-α 1a 235 pM (InvivoGen). Las células se incubaron durante 20 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % con diversas concentraciones de TNF-R2 de fusión directa o cuerpo de fusión de cadena

sencilla de TNF-R2 (TNF-R2 scC_LC_H1-Fc). Se detectó la producción de SEAP añadiendo QUANTI-Blue e incubando durante 3 horas a 37 °C, CO₂ 5 % y se leyó en un lector de placas a 630 nm. La activación del gen de SEAP puede ser inhibida por el antagonista de TNF- α TNF-R2 de una manera dependiente de la dosis. La molécula de cuerpo de fusión monocatenario TNF-R2 inhibió la activación del gen de SEAP con una CI₅₀ de 51 pM frente a la fusión directa de TNF-R2 con una CI₅₀ de 112 pM (fig. 6).

PK de rata de TNF-R2 scC_LC_H1-Fc

Se administraron dosis intravenosas individuales de TNF-R2 scC_LC_H1-Fc 5 mg/kg en la vena lateral de la cola de 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre a las 0,083, 1, 6, 24, 48 h, 5, 7, 9, 12, 15, 21, 28 días después de la administración de TNF-R2 scC_LC_H1-Fc. Las concentraciones se midieron utilizando técnicas convencionales de MSD con Fc IgG de cabra anti F(ab')₂ humano (Thermo Scientific, Rockford, IL) como anticuerpo de captura y anticuerpo de cabra anti-IgG humana Fc de adsorción cruzada biotinilado (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) como anticuerpo de detección. Se realizó análisis farmacocinético utilizando modelado no compartimental con el programa informático WinNonlin® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos derivadas de los datos de MSD incluyeron la concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva de tiempo frente a concentración (ABC) y semivida de eliminación (t_{1/2}) (fig. 7 y tabla 2).

Tabla 2

Artículo de prueba	Animal de ensayo	Vía de dosificación	Dosis	C _{máx}	ABC _{0-∞}	t _{1/2}
			(mg/kg)	(nM)	(nM-h)	(h)
Fusión directa de TNF-R2	rata	IV	5	584 ± 59,2	3445 ± 967	24 ± 6,5
TNF-R2 scC _L C _H 1-Fc	rata	IV	5	412 ± 109	3207 ± 157	102 ± 33

Ejemplo 3: IL1Ra

Diseño de IL1Ra scC_LC_H1-Fc

La molécula de IL1Ra monocatenaria contiene la secuencia de IL1Ra seguida de un conector de 10 restos, GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11), el dominio CL de IgG1 seguido de un conector de 20 restos, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12) seguido de las partes CH1, bisagra y Fc de IgG1 humana.

Expresión de IL1Ra scC_LC_H1-Fc

El gen que tiene la siguiente secuencia de ADN:

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGTCTGTATCGCCCTGTCTCTGGCCCTGGTC
 ACCAACTCCAGACCCCTCTGGCCGGAAGTCTCCAAGATGCAGGCCTTCCGGATCT
 GGGACGTGAACCAGAAAACCTTCTACCTGCGGAACAACCAGCTGGTGGCCGGCT
 ATCTGCAGGGCCCCAACGTGAACCTGGAAGAGAAGATCGACGTGGTGGCCATCG
 AGCCCCACGCCCTGTTTCTGGGAATCCACGGCGGCAAGATGTGCCTGTCTGCGT
 GAAGTCCGGCGACGAGACACGGCTGCAGCTGGAAGCCGTGAACATCACCGACCT
 GTCCGAGAACCAGGAAGCAGGACAAGAGATTGCGCTTCATCAGATCCGACTCCGG
 CCCTACCACCTCCTTCGAGTCTGCTGCTTGCCCCGGCTGGTTCCTGTGCACCGCCA
 TGGAAGCTGACCAGCCCGTGTCCCTGACCAACATGCCTGACGAGGGCGTGATGG
 TCACCAAGTTCTATTTTCAGGAAGATGAGGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGAG
 GATCTAGAACAGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAGCA
 GCTGAAGTCTGGCACCGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCTCGC
 GAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAG
 GAATCCGTCAACGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCC
 TGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGA
 CCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAAAGCG
 GAGGCGGAGGTTCAAGTGGTGGTGATCAGGTGGCGGCGGATCTGGCGGTGGTG
 GCTCTGCTTCTACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCT
 ACCTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGC
 CTGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTGTGACATCCGGCGTGCACACCTTCCC
 TGCTGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACAGCCTGTCTCCGTCTGACCGTGCCTT
 CCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCTCCAA
 CACCAAGTGGACAAGCGGGTGAACCCAAGTCTCCGACAAGACCCACACCTG
 TCCTCCCTGCCCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCTC
 CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGG
 TGGTCGATGTGTCCCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACG
 GCGTGGAAGTGACAATGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCA
 CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACGAGATTGGCTGAACGGCAA
 AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGAC
 CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCC
 AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCACTGACCTGTCTGGTCAAGGGC
 TTCTACCCCTCCGACATTGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAAC
 AACTACAAGACCAACCCCTCCCGTGTGGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACT
 CCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTC

CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGC CCCGGAAG (SEQ ID NO: 15); se sintetizó (Genewiz, Inc.), se clonó en pcDNA/UCOE y se expresó transitoriamente en células HEK293 usando el sistema de expresión Expi293 (Life Technologies). Las proteínas se purificaron primero usando proteína A (GE Healthcare) con elución de pH bajo y se dializaron frente a 2 l de PBS 1X 3 veces. La molécula se analizó mediante gel SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (fig. 8A y 8B). Para condiciones no reductoras, se cargaron 5 µg de proteína purificada en un gel de TRIS-acetato al 3-8 % NuPAGE® NOVEX® (Invitrogen) con un patrón de proteína preteñido HIMARK™ (Invitrogen) (intervalo de PM 31 kD - 460 kD). Para condiciones reductoras, se cargaron 5 µg de proteína en un gel Any kD™ (Invitrogen) con un patrón Kaleidoscope PRECISION PLUS PROTEIN™ (Invitrogen) (intervalo de PM 10 kD - 250 kD).

Bioactividad de IL1Ra scC_LC_H1-Fc

Las células HEK-Blue™ IL-1 β (InvivoGen) son células renales embrionarias humanas diseñadas específicamente para detectar IL-1 β bioactivo *in vitro* supervisando la activación de las rutas NF-κB/AP-1. La línea celular expresa un gen indicador inducible de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) bajo el control del promotor mínimo de IFN-β fusionado con cinco sitios de unión NF-κB y cinco AP-1. Para el ensayo de antagonista de IL-1 β, se sembraron en placas células HEK-Blue IL-1β a 50.000 células/pocillo en medio DMEM que contenía L-glu 2 mM y FBS termoinactivado al 10 % (Gibco) e IL-1β 57 pM (R&D systems). Las células se incubaron durante 20 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % con diversas concentraciones de IL1RascC_LC_H1-Fc. Se detectó la producción de SEAP añadiendo QUANTI-Blue e incubando durante 3 horas a 37 °C, CO₂ 5 % y se leyó en un lector de placas a 630 nm. La activación de IL-1 β del gen de SEAP puede ser inhibida por el antagonista de IL-1 β IL-1Ra de una manera dependiente de la dosis. La molécula monocatenaria de IL-1Ra inhibió la activación de IL-1 β del gen de SEAP con una CI₅₀ de 12,5 Nm (fig. 9).

PK de rata de IL1Ra scC_LC_H1-Fc

Se administraron dosis intravenosas individuales de IL1Ra scC_LC_H1-Fc 2 mg/kg en la vena lateral de la cola de 3 ratas.

Se recogieron muestras de sangre a las 0,083, 0,25, 1, 2, 6, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración de IL1Ra scC_LC_H1-Fc. Se administraron dosis subcutáneas individuales de IL1Ra scC_LC_H1-Fc 5 mg/kg en la región interescapular de 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre a las 0,25, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración de IL1Ra scC_LC_H1-Fc. Las concentraciones se midieron utilizando técnicas convencionales de MSD con Fc IgG de cabra anti F(ab')₂ humano (Thermo Scientific, Rockford, IL) como anticuerpo de captura y conjugado de biotina anti-IL1Ra humana de ratón (Invitrogen, Grand Island, NY) como anticuerpo de detección. Se realizó análisis farmacocinético utilizando modelado no compartimental con el programa informático WINNONLIN® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos derivadas de los datos de MSD incluyeron la concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva de tiempo frente a concentración (ABC) y semivida de eliminación (t_{1/2}) (fig. 10 y tabla 3).

Tabla 3

Artículo de prueba	Animal de ensayo	Vía de dosificación	Dosis (mg/kg)	C _{máx} (nM)	ABC _{0-∞} (nM-h)	t _{1/2} (h)
IL1Ra-scC _L C _H 1-Fc	rata	IV	2	375 ± 7,6	1828 ± 139	9,8 ± 0,9
IL1Ra-scC _L C _H 1-Fc	rata	sc	5	24,7 ± 34,1	363 ± 476	9,4 ± 1,6
rhIL-1Ra*	rata	IV	1	448,5 ± 134	98,5 ± 5,8	1,15 ± 0,5
rhIL-1Ra*	rata	SC	1	25,3 ± 3,5	74,1 ± 9,3	0,85 ± 0,08

*Fuente: Documento de la FDA BLA: 103950/0. Los parámetros PK se convirtieron a concentraciones nM utilizando un PM de 17257,6 g/mol para rhIL-1Ra

PK intraocular de IL1Ra scC_LC_H1-Fc

Una inyección intravítrea de embolada de 0,5 mg de IL1Ra scC_LC_H1-Fc en cada ojo de 8 conejos machos. Se recogieron muestras de sangre de dos animales a las 4, 96, 168 y 336 horas después de la administración de IL1Ra scC_LC_H1-Fc. En el momento del sacrificio, se recogieron ambos ojos de cada animal y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Las concentraciones se midieron utilizando técnicas convencionales de MSD. Se realizó análisis farmacocinético utilizando modelado no compartimental con el programa informático WINNONLIN® (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos derivadas de los datos de MSD incluyeron la concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva de tiempo frente a concentración (ABC) y semivida de eliminación (t_{1/2}) (fig. 4 y fig. 11).

Tabla 4

Artículo de prueba	Animal de ensayo	Matriz	C _{máx} (µg/ml)	ABC _{0-∞} (µg/ml-h)	t _{1/2} (h)
IL1Ra scC _L C _H 1-Fc	conejo	Acuosa	2,53	369	83
IL1Ra scC _L C _H 1-Fc	conejo	Vítrea	265	2904	129

Ejemplo 4: IL-2/IL2Ra

Diseño de IL-2/IL-2Ra scC_LC_H1-Fc e IL-2/IL-2Ra scC_H1-C_L-Fc

La molécula de cuerpo de fusión monocatenaria IL-2/IL-2Ra contiene una IL-2 humana permutada circularmente unida al dominio extracelular de la proteína de fusión IL-2Ra unida al dominio CL-CH1-Fc (SEQ ID NO: 19) o al CH1-CL-Fc (SEQ ID NO: 20) de la cadena pesada de IgG1 (fig. 12A y 12B) denominado en el presente documento IL-2/IL-2Ra scC_LC_H1-Fc e IL-2/IL-2Ra scC_H1-C_L-Fc, respectivamente. Para la expresión en células de mamíferos, la secuencia líder N-terminal de la SEQ ID NO: 10 se añadió a la proteína de las SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

Expresión de IL-2/IL-2Ra scC_LC_H1-Fc e IL-2/IL-2Ra scC_H1-C_L-Fc

Los genes se sintetizaron sintéticamente y se suministraron en el vector de expresión pcDNA3.1 (GeneArt), y se expresaron transitoriamente en células HEK293 utilizando el sistema de expresión Expi293 (Life Technologies). Las proteínas se purificaron usando proteína A (GE Healthcare) con elución de pH bajo y se dializaron frente a 2 l de PBS 1X 2 veces.

Las moléculas se analizaron mediante gel SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (fig. 13). Para condiciones reductoras y no reductoras, se cargaron 5 µg de proteína en un gel Any kD (Invitrogen) con un patrón Kaleidoscope Precision Plus Protein (Invitrogen) (intervalo de PM 10 kD-250 kD). La molécula se caracterizó por filtración analítica en gel en una columna SEC BioSuite de ultra alta resolución, 250 Å, 4 µm, 4,6 mm X 300 mm (Waters). La columna se equilibró y se procesó a 0,3 ml/min con fosfato de sodio 150 mM pH 7,0 como tampón de ejecución para todos los análisis. Se inyectaron muestras purificadas (0,5 mg/ml) (15 µl) y se eluyeron con un tiempo de ejecución de 25 min (fig. 14A y 14B).

Bioactividad de IL-2/IL-2Ra scC_LC_H1-Fc e IL-2/IL-2Ra scC_H1-C_L-Fc

La bioactividad *in vitro* se valoró evaluando la capacidad de IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1}-Fc e IL-2/IL-2R α scC_{H1}C_L-Fc para activar pSTAT5 en la línea celular de linfoma de linfocitos T de HH humana (ATCC CRL-2105) utilizando el equipo de ELISA fosfo-STAT5A/B (Tyr694/Tyr699) InstantOne™ de eBioscience. Para el ensayo, las células HH se sembraron en placas a 2 x 10⁵ células/pocillo en medio RPMI1640 que contiene FBS al 10 %. Las muestras se incubaron con concentraciones decrecientes de IL-2 de tipo silvestre (tsIL-2), IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1} Fc o IL-2/IL-2R α scCH2C1 Fc de aproximadamente 50 nM, o sin estimular, durante aproximadamente 25 ± 5 minutos en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C. La reacción de estimulación se terminó mediante la rápida adición de 25 µl de mezcla de lisis celular (proporcionada en el equipo) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación constante a 300 rpm en un agitador de placas de titulación. Se añadieron alícuotas de 50 µl de los lisados resultantes a cada pocillo en la placa de ensayo (proporcionada en el equipo). Después de añadir 50 µl de cóctel de anticuerpos a cada pocillo, la placa se cubrió y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación constante a 300 rpm en un agitador de placas de titulación. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado 1X. Se añadieron 100 µl de reactivo de detección a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación constante a 300 rpm. La reacción de detección se detuvo mediante la adición de 100 µl de solución de parada y se midió la absorbancia a 450 nM utilizando un lector de placas SynergyMx. IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1} Fc (CE₅₀ = 0,97 nM), o IL-2/IL-2R α scCH2C1 Fc (CE₅₀ = 1,1 nM) y wtIL-2 (CE₅₀ = 0,80 nM) eran activos de una manera dependiente de la dosis (fig. 15).

PK de rata de IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1}-Fc e IL-2/IL-2R α scC_{H1}C_L-Fc

Se administraron dosis intravenosas individuales de 1 mg/kg de IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1}-Fc e IL-2/IL-2R α scC_{H1}C_L-Fc en una vena de la cola de 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre a las 0,083, 0,25, 0,5, 1, 3, 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración de IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1}-Fc e IL-2/IL-2R α scC_{H1}C_L-Fc. Se administraron dosis subcutáneas individuales de 2 mg/kg de IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1}-Fc e IL-2/IL-2R α scC_{H1}C_L-Fc en la región interescapular de 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre a las 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración de IL-2/IL-2R α scC_LC_{H1}-Fc e IL-2/IL-2R α scC_{H1}C_L-Fc. Las concentraciones se midieron utilizando técnicas convencionales de MSD. Se realizó análisis farmacocinético utilizando modelado no compartimental con el programa informático WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos derivadas de los datos de MSD incluyeron la concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva de tiempo frente a concentración (ABC) y semivida de eliminación (t_{1/2}) (fig. 16 y tabla 5).

Tabla 5

Artículo de prueba	Dosificación	Dosis	T _{máx}	C _{máx}	ABC _{0-∞}	t _{1/2}	TMR	CL	Vd	F
	Vía	(nmol/kg)	(h)	(nM)	(nM·h)	(h)	(h)	(ml/h/kg)	(ml/kg)	(%)
IL-2/IL-2R α scCLCH1 Fc	IV	6	0,083	82,9 ± 12,0	876 ± 162	23,4 ± 4,4	25,6 ± 4,2	6,78 ± 0,125	174 ± 31,5	
IL-2/IL-2R α scCLCH1 Fc	SC	12	48	6,67 ± 0,35	483 ± 56,9	15,3 ± 3,6	55,0 ± 1,7			28
IL-2/IL-2R α scCH1CL Fc	IV	6	0,083	65,5 ± 7,6	505 ± 66,4	39,5 ± 4,7	26,3 ± 1,7	11,9 ± 1,6	313 ± 47,7	
IL-2/IL-2R α scCH1CL Fc	SC	12	(24,48)	3,36 ± 0,84	290 ± 1,0	32,9 ± 0,3	70,2 ± 8,8			29

Nota: media ± DT para todos los parámetros excepto la mediana (mín, máx) para T_{máx}, n = 3 a menos que se indique lo contrario; F = % de relación de ABC_{0-∞} normalizada por dosis después de SC frente a IV

Ejemplo 5: IFN β

Diseño de IFN β scC_LC_{H1}-Fc

La molécula de cuerpo de fusión monocatenaria de IFN β contiene IFN β (C17S) unido al dominio CL-CH1-Fc de la cadena pesada de IgG1 (fig. 17). Para la expresión en células de mamíferos, la secuencia líder N-terminal de la SEQ ID NO: 10 se añadió a la proteína de la SEQ ID NO: 18.

Expresión de IFN β scC_LC_{H1}-Fc

El gen se sintetizó sintéticamente y se suministró en el vector de expresión pcDNA3.1 (GeneArt), y se expresó transitoriamente en células HEK293 utilizando el sistema de expresión Expi293 (Life Technologies). La proteína se purificó usando proteína A (GE Healthcare) con elución de pH bajo y se dializó frente a 2 l de PBS 1X 2 veces.

La molécula se analizó mediante gel SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (fig. 18). Para condiciones reductoras y no reductoras, se cargaron 5 µg de proteína en un gel Any kD (Invitrogen) con un patrón Kaleidoscope Precision Plus Protein (Invitrogen) (intervalo de PM 10 kD - 250 kD). La molécula se caracterizó por filtración analítica en gel en una columna SEC BioSuite de ultra alta resolución, 250 Å, 4 µm, 4,6 mm X 300 mm (Waters). La columna se equilibró y se procesó a 0,3 ml/min con fosfato de sodio 150 mM pH 7,0 como tampón de ejecución para todos los análisis. Se inyectaron muestras purificadas (0,5 mg/ml) (15 µl) y se eluyeron con un tiempo de ejecución de 60 min

(fig. 19).

Bioactividad de IFN β scC_LC_H1-Fc

5 Las células HEK-Blue™ IFN α/β (InvivoGen) son células renales embrionarias humanas diseñadas específicamente para detectar IFN de tipo I bioactivos *in vitro* supervisando la activación de la ruta ISGF3. La línea celular expresa un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible bajo el control del promotor ISG54 inducible por IFN α/β . Para el ensayo de agonista de IFN β , se sembraron en placas células HEK-Blue IFN α/β a 50.000 células/pocillo en medio DMEM que contenía L-glutamina 2 mM, 4,5 g/l de glucosa y FBS termoinactivado al 10 % (Gibco). Las células se incubaron durante 20 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % con diversas concentraciones de IFN β scC_LC_H1-Fc o tsIFN β (Peprotech). Se detectó la producción de SEAP añadiendo QUANTI-Blue e incubando durante 3 horas a 37 °C, CO₂ 5 % y se leyó en un lector de placas a 630 nm. IFN β scC_LC_H1-Fc (CE₅₀ = 0,9 pM) y tsIFN β (CE₅₀ = 0,6 pM) eran activos de una manera dependiente de la dosis (fig. 20).

PK de rata de IFN β scC_LC_H1-Fc

Se administró una dosis intravenosa individual de IFN β scC_LC_H1-Fc 0,5 mg/kg en un catéter de la vena yugular implantado de forma quirúrgica de 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre a las 0,083, 0,25, 0,5, 1, 3, 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración de IFN β scC_LC_H1-Fc. Se administró una dosis subcutánea individual de IFN β scC_LC_H1-Fc 1 mg/kg en la región interescapular de 3 ratas. Se recogieron muestras de sangre a las 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la administración de IFN β scC_LC_H1-Fc. Las concentraciones se midieron utilizando técnicas convencionales de MSD. Se realizó análisis farmacocinético utilizando modelado no compartimental con el programa informático WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Las estimaciones de los parámetros farmacocinéticos derivadas de los datos de MSD incluyeron la concentración máxima (C_{máx}), área bajo la curva de tiempo frente a concentración (ABC) y semivida de eliminación (t_{1/2}) (fig. 21 y tabla 6).

Tabla 6

Vía	Dosis	ID del animal	C _{máx}	T _{máx}	C _{máx} /D	ABC _∞	ABC _∞ /D	CL	V _{ss}	t _{1/2}	T _M	%F
	(nMoles/kg)		(nM)	(h)	(kg*nM/nmol)	(h*nM)	(h*kg*nM/nmol)	(ml/h/kg)	(ml/kg)	(h)	(h)	(%)
IV	1,4	67363	61,1	0,083	42,7	1320	921	1,09	111	87	100	
		67364	54,7	0,083	38,2	1320	924	1,08	129	110	120	
		67366	109	0,083	76,6	1790	1250	0,801	106	120	130	
		Media	75,1	0,083	52,5	1480	1030	0,991	115	100	120	
		DT	30	NA	21	272	190	0,164	12,3	14	15	
SC	3,6	67367	16,4	48	4,57	ND	ND	NA	NA	ND	ND	
		67369	12,8	24	3,57	2150	600	NA	NA	87	140	
		Media	14,6	36	4,07	2150	600	NA	NA	87	140	58,3
		DT	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

Ejemplo 6: IL-10Diseño de scIL-10:CL:CH1:Fc y scIL-10: CH1:CL:Fc

La molécula de cuerpo de fusión monocatenaria scIL-10 contiene una proteína de fusión homodimérica de IL-10 unida covalentemente unida al dominio CL-CH1-Fc o al CH1-CL-Fc de la cadena pesada de IgG1 (fig. 22A y 22B). Las secuencias de aminoácidos de cada molécula sintetizada se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7

Proteína	Secuencia
scIL-10:CL:CH1:Fc	MYRMOLLSCIALSLALVTNSSPGQGTSQENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEYMPQAEQNDPDIAHVNLSLGENLKTLLRLRLRRCHRLF PCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGGGGGGGSGGSPGQGTQS ENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLKESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEE EYMPQAEQNDPDIAHVNLSLGENLKTLLRLRLRRCHRLFPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKA MSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGGGGGGGSGGGSRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFN RGECCGGGGGGGGGGGGGGGGSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTOKSLSPGK (SEO ID NO: 23)

(continuación)

Proteína	Secuencia
sclL-10:CH1: CL:Fc	<u>MYRMQLLSCLSLALVTNSSPGQGTQSENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL</u> LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRF PCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGSGGGSGGSGPGQGTQS ENSC THFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEE FVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKA MSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGSGGGSGGSGSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVGGGGSG GGSGGGGGSGGGSGRTVAAPSVFIEPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSGGEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)
sclL-10:Fc (Control)	<u>MYRMQLLSCLSLALVTNSSPGQGTQSENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL</u> LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRF PCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGSGGGSGGSGPGQGTQSENSCTH FGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQA ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFI NYIEAYMTMKIRNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)

Expresión de sclL-10:CL:CH1:Fc y sclL-10: CH1:CL:Fc

- 5 Los genes se sintetizaron sintéticamente y se suministraron en el vector de expresión pcDNA3.1 (GeneArt), y se expresaron transitoriamente en células HEK293 utilizando el sistema de expresión Expi293 (Life Technologies). Las proteínas se purificaron usando proteína A (GE Healthcare) con elución de pH bajo y se dializaron frente a 2 l de PBS 1X 2 veces.
- 10 Las moléculas se analizaron mediante gel SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (fig. 23). Para condiciones reductoras y no reductoras, se cargaron 2,5 µg de proteína en un gel Any kD (Invitrogen) con un patrón Kaleidoscope Precision Plus Protein (Invitrogen) (intervalo de PM 10 kD - 250 kD). La molécula se caracterizó mediante filtración en gel analítica en una columna XBridge Protein BEH SEC, 200 Å, 3,5 µm, 7,8 mm X 150 mm (Waters). La columna se equilibró y se procesó a 0,9 ml/min con fosfato de sodio 100 mM pH 7,0 como tampón de ejecución para todos los análisis. Se inyectaron muestras purificadas (0,5 mg/ml) (15 µl) y se eluyeron con un tiempo de ejecución de 15 min (fig. 24A y 24B).

Bioactividad de sclL-10:CL:CH1:Fc y sclL-10:CH1:CL:Fc

- 20 La bioactividad *in vitro* se valoró evaluando la capacidad de sclL-10:CL:CH1:Fc y sclL-10:CH1:CL:Fc para estimular la proliferación de la línea de mastocitos de ratón MC/9 (ATCC CRL-8306). La proteína de fusión Fc de sclL-10 directa (sclL-10:Fc) se usó como control. Para el ensayo, las células MC/9 se sembraron en placas a 10.000 células/pocillo en medio DMEM que contenía suero bovino fetal termoinactivado al 10 %, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol 0,05 mM. Las células se incubaron durante 72 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % con diversas concentraciones de IL-10 humana (R&D Systems), sclL-10:CL:CH1:Fc, sclL-10:CH1:CL:Fc o sclL-10:Fc. Después de 72 horas, las células se tiñeron con CellTiter-Blue (Promega) durante 4 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % según el protocolo del fabricante. Se tomaron medidas fluorescentes a 560/590 nm. IL-10 (CE₅₀ = 75 pM), sclL-10:CL:CH1:Fc (CEC₅₀ = 79 pM), sclL-10:CH1:CL:Fc (CE₅₀ = 93 pM) y sclL-10:Fc (CE₅₀ = 493 pM) eran activos de una manera dependiente de la dosis (fig. 25).

PK de ratón de sclL-10:CL:CH1:Fc y sclL-10:CH1:CL:Fc

- Se evaluó la farmacocinética de sclL-10:CL:CH1:Fc, sclL-10:CH1:CL:Fc y sclL-10:Fc en ratones con una dosis única intravenosa de 0,5 mg/kg administrada en la vena de la cola y una única dosis subcutánea de 2,5 mg/kg administrada en la región interestriar. Se recogieron muestras de sangre (n = 3 muestras/punto temporal/proteína de fusión) a las 0,083, 0,5, 1, 4, 6, 24, 48, 96, 168, 192 y 216 horas después de la administración de sclL-10:CL:CH1:Fc, sclL-10:CH1:CL:Fc y sclL-10:Fc. Para cada punto temporal/proteína de fusión/vía de administración, se agrupó el suero y se midieron las concentraciones utilizando técnicas convencionales de MSD. Los datos bioanalíticos se sometieron a análisis farmacocinético no compartimental utilizando el programa informático Phoenix WinNonlin 6.4. El parámetro farmacocinético incluyó parámetros farmacocinéticos convencionales de concentración máxima (C_{máx}), tiempo hasta la concentración máxima (T_{máx}), área bajo la curva de tiempo frente a concentración (ABC), tiempo medio de permanencia (TMP), semivida de eliminación (t_{1/2}), aclaramiento (CL), volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) y biodisponibilidad (% F) que se determinaron y se indican en las tablas 8 y 9.

Tabla 8

ID de fila	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Dosis (~ nMoles/kg)	ROA	C _{máx} (nM)	T _{máx} (h)	C _{máx} /D (nM/D)	ABC _{final} (h*nM)
1	scIL-10:Fc	0,5	3,93	IV	94,9	0,083	24,2	2080
2	scIL-10:Fc	2,5	19,63	SC	221	24	11,3	12700
3	scIL-10:C _L :C _{H1} :Fc	0,5	2,85	IV	140	0,083	49,2	2850
4	scIL-10:C _L :C _{H1} :Fc	2,5	14,25	SC	227	24	15,9	19500
5	scIL-10:C _{H1} :C _I :Fc	0,5	2,84	IV	115	0,083	40,5	1300
6	scIL-10:C _{H1} :C _I :Fc	2,5	14,2	SC	120	24	8,48	7570

Tabla 9

ID de fila	ABC _{inf} (h*nM)	ABC _{inf} /D (h*nM)	TMR _{inf} (h)	t _{1/2} (h)	CL (ml/h/kg)	V _{ss} (ml/kg)	%F
1	2170	552	33	21	1,811	59,57	NA
2	12700	649	46	11	NA	NA	~ 100
3	2850	999	30	7,8	1,001	29,56	NA
4	19500	1370	56	8,5	NA	NA	~100
5	1300	458	16	9,3	2,183	35,44	NA
6	7570	533	41	9,1	NA	NA	~100

5 Las publicaciones científicas y de patentes a las que se hace referencia en el presente documento establecen el conocimiento que está disponible para los expertos en la materia.

Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito en particular con referencias a elementos preferidos de la misma, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar en la misma diversos cambios en la forma y los detalles sin alejarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión monocatenaria que tiene la siguiente disposición desde el extremo amino al extremo carboxilo:

X-L1-BISAGRA-Fc

en donde,

X es IL-10, IL-2, IL-2R α o fusiones del mismo, IFN β , factor IX, antagonista de TNFR2 o IL-1R (IL-1 Ra);
L1 es un conector que tiene la siguiente disposición desde el extremo amino al extremo carboxilo:

L2-CL-L3-CH1-L4

en donde,

L2 y L4 son de manera independiente conectores polipeptídicos y en donde L2 está presente y L4 está ausente;

L3 es un conector polipeptídico;

CL es un polipéptido de región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina; y

CH1 es un polipéptido de región constante de un dominio CH1 de una cadena pesada de inmunoglobulina;

BISAGRA es una secuencia de bisagra de una inmunoglobulina; y

Fc es el extremo carboxilo de una inmunoglobulina o cualquier fragmento activo de la misma.

2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde CL, CH1, BISAGRA y Fc son al menos 90 % idénticos a las regiones CL, CH1, bisagra y Fc, respectivamente, de IgG1 humana.

3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde L3 es un conector polipeptídico que tiene la secuencia de aminoácidos (GGGGS) $_n$ en donde n es 1-5.

4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde L2 es un conector polipeptídico que tiene la secuencia de aminoácidos (GGGGS) $_n$ en donde n es 1-5.

5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde X comprende IL-2 permutada circularmente, fusionada con IL-2R α mediante un conector opcional.

6. Un complejo dimerizado que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1.

7. El complejo dimerizado de la reivindicación 6, en donde el complejo dimerizado es un complejo homodimérico.

8. El complejo dimerizado de la reivindicación 7, en donde X es IL-10 o una proteína de fusión homodimérica de IL-10 unida covalentemente.

9. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde X es una proteína de fusión homodimérica de IL-10 unida covalentemente.

10. La proteína de fusión de la reivindicación 9 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 23.

11. La proteína de fusión de la reivindicación 1 que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 18 y 19.

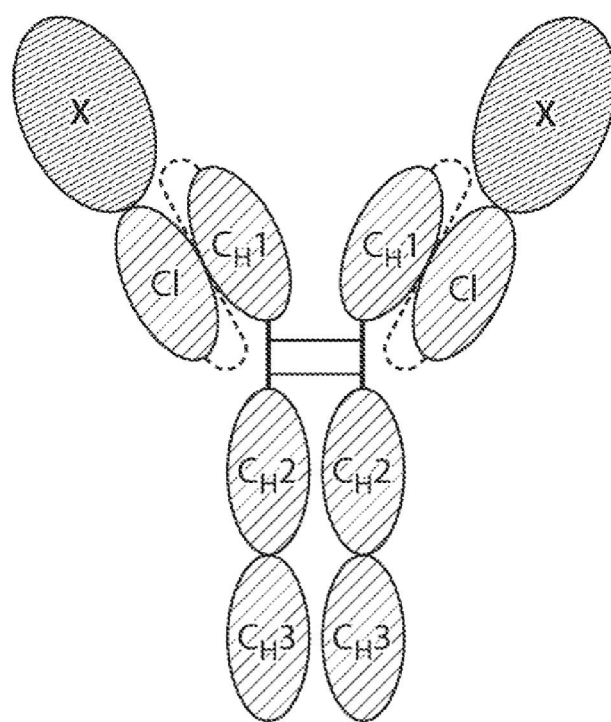


FIG. 1A

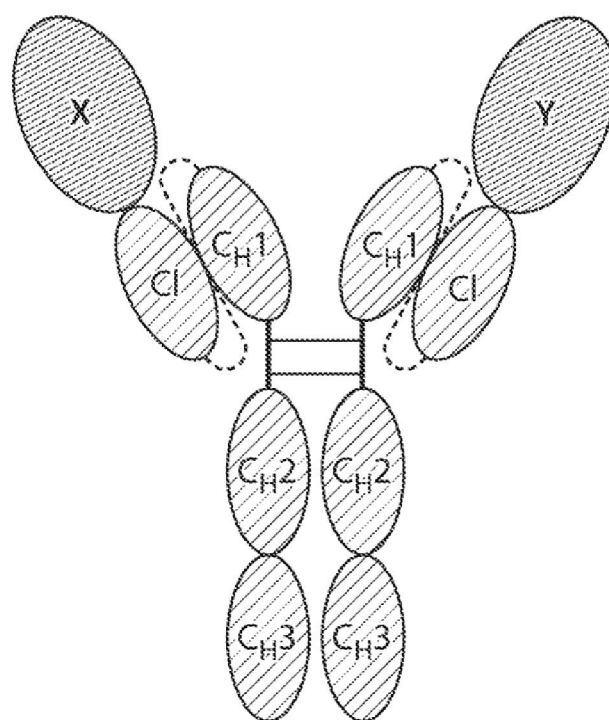


FIG. 1B

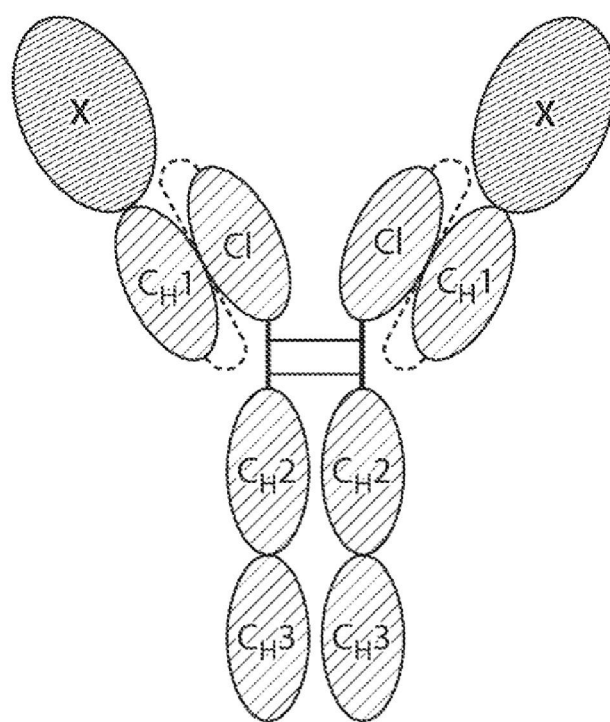


FIG. 1C

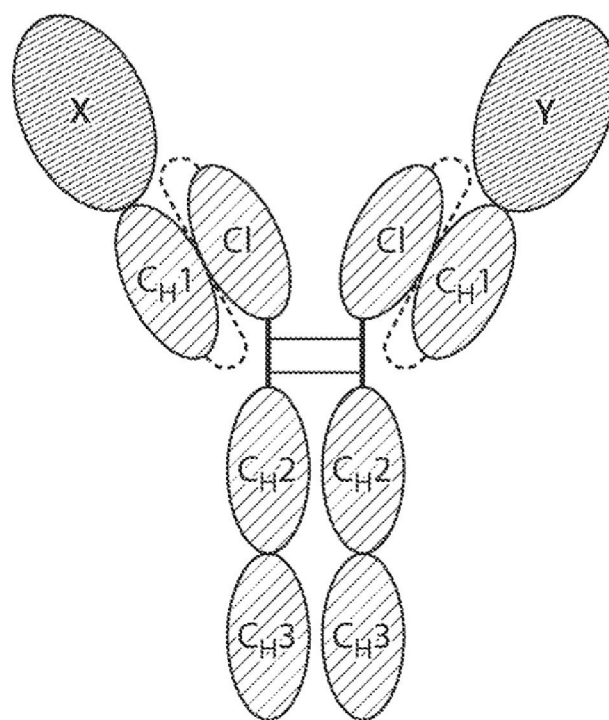


FIG. 1D

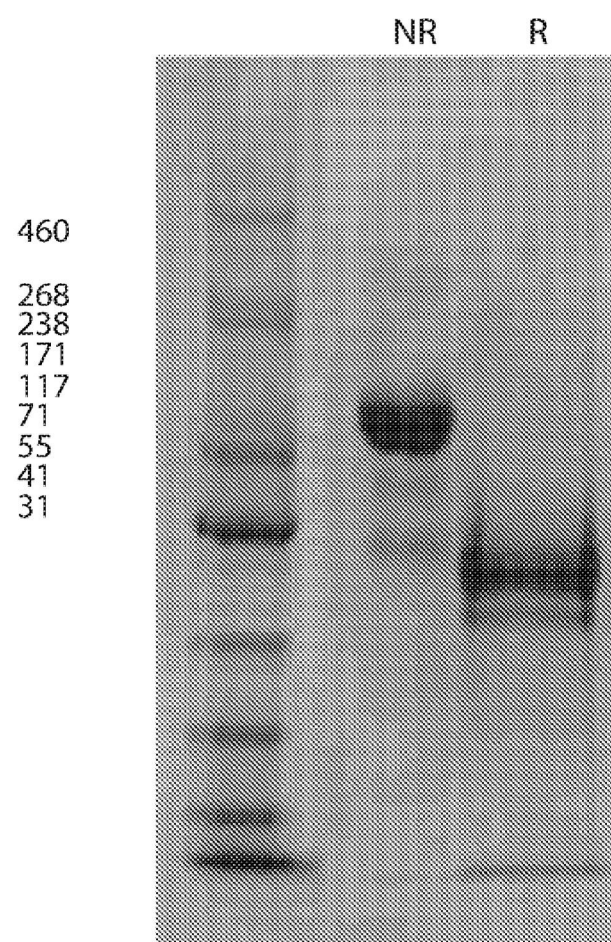


FIG. 2

Determinación de UI

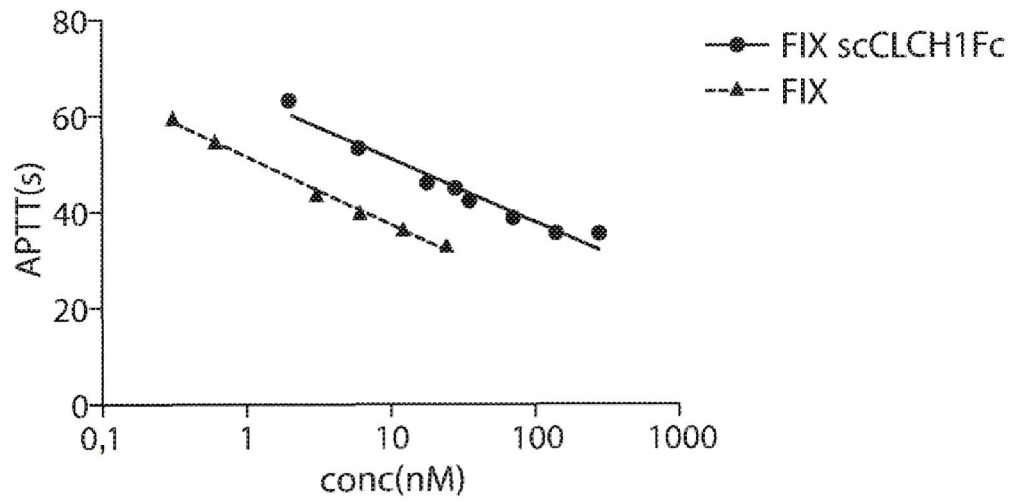


FIG. 3

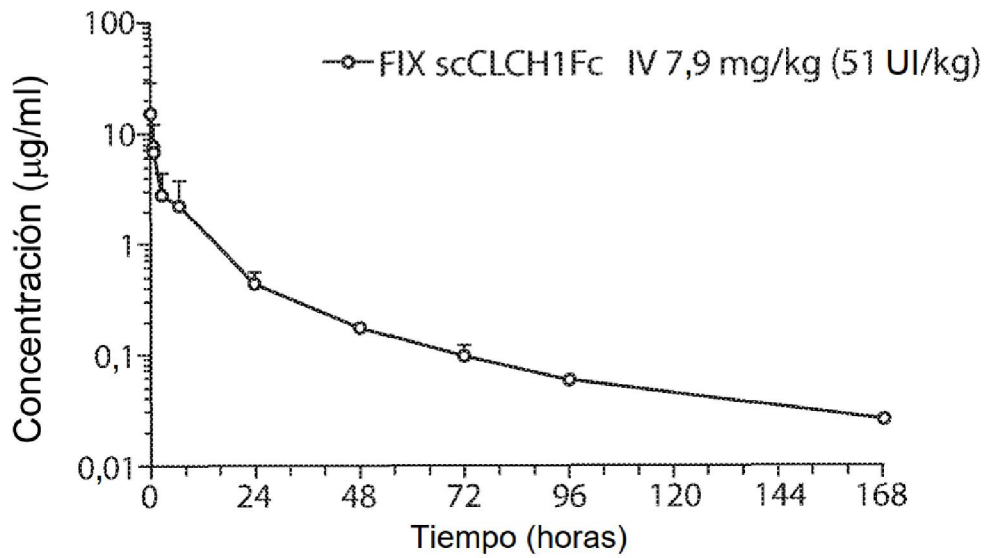


FIG. 4

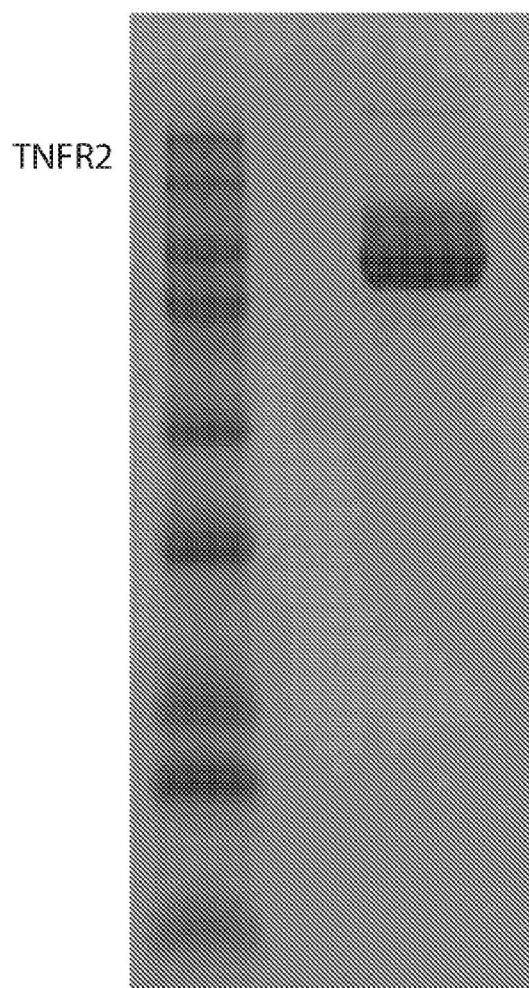


FIG. 5A

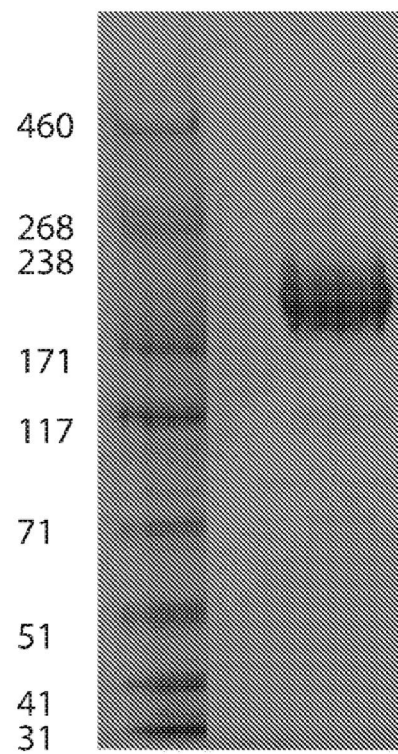
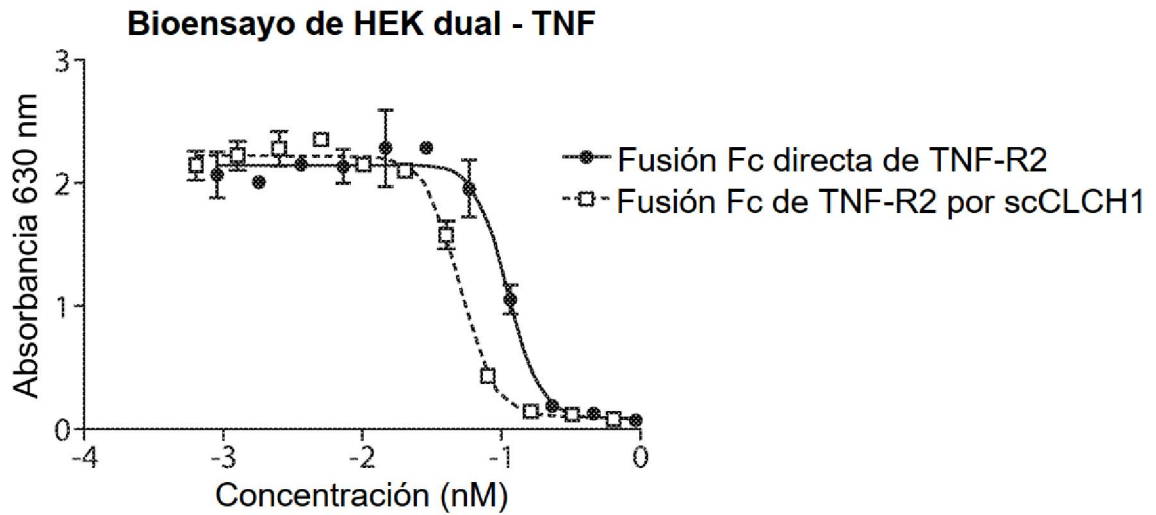


FIG. 5B



IC₅₀ de Fc de TNF-R2 directa = 12 ng/ml (112 pM)

IC₅₀ de Fc de TNF-R2 scCLCH1 = 7,85 ng/ml (51 pM)

FIG. 6

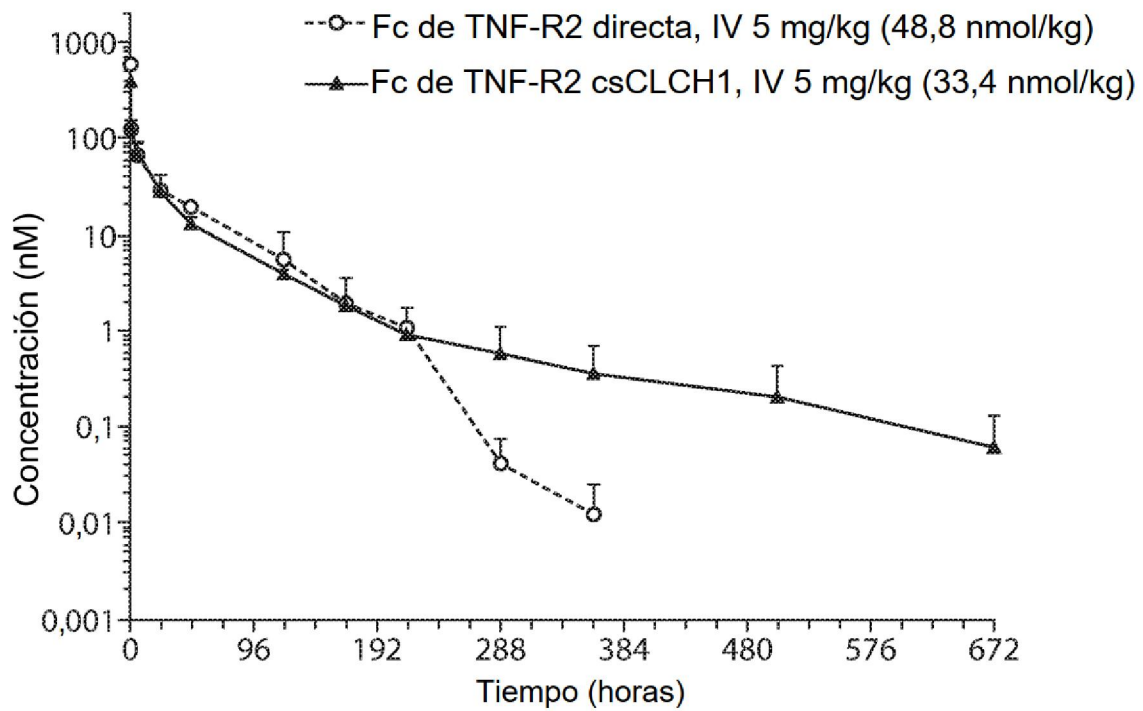


FIG. 7



FIG. 8A

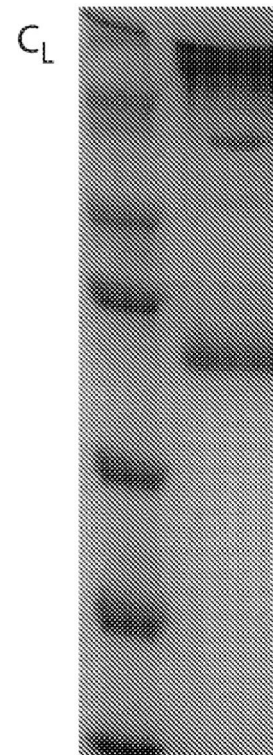


FIG. 8B

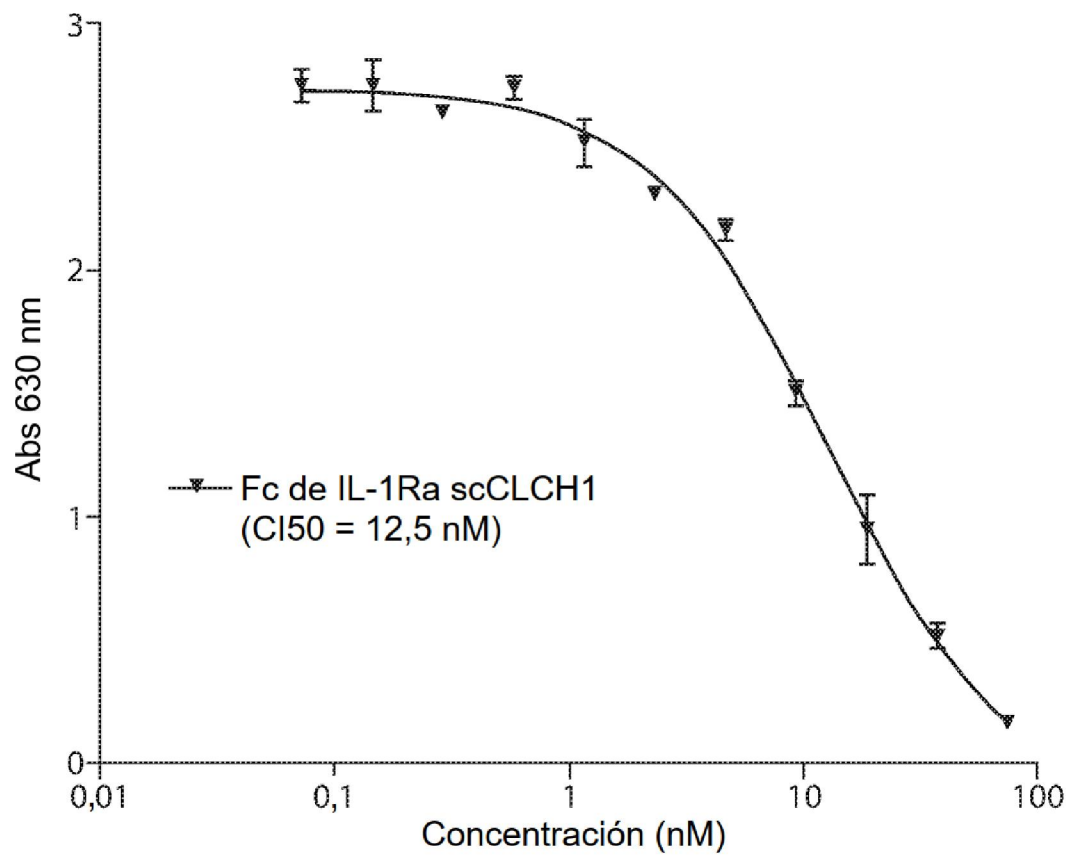


FIG. 9

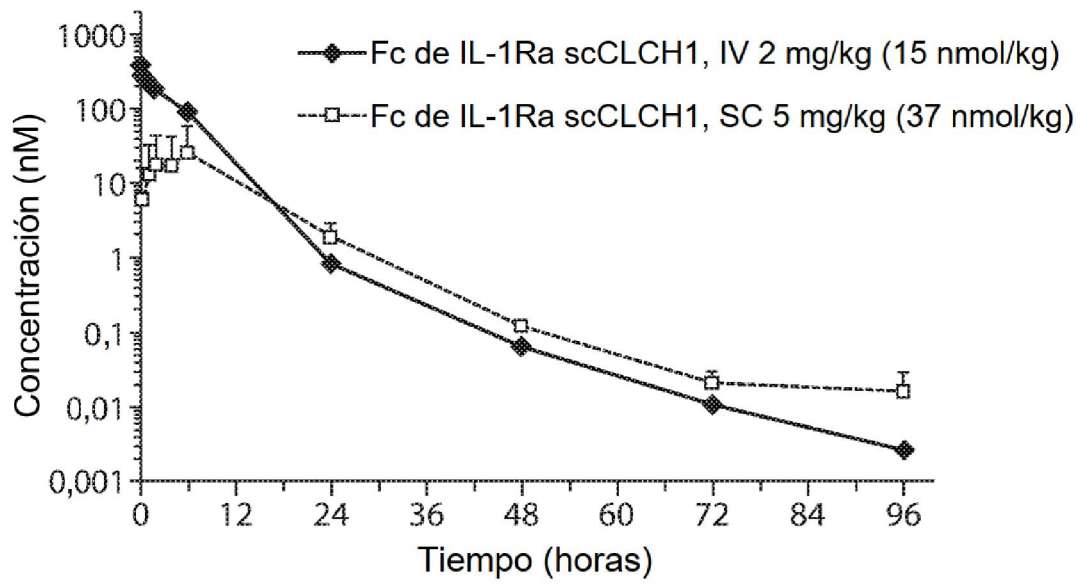


FIG. 10

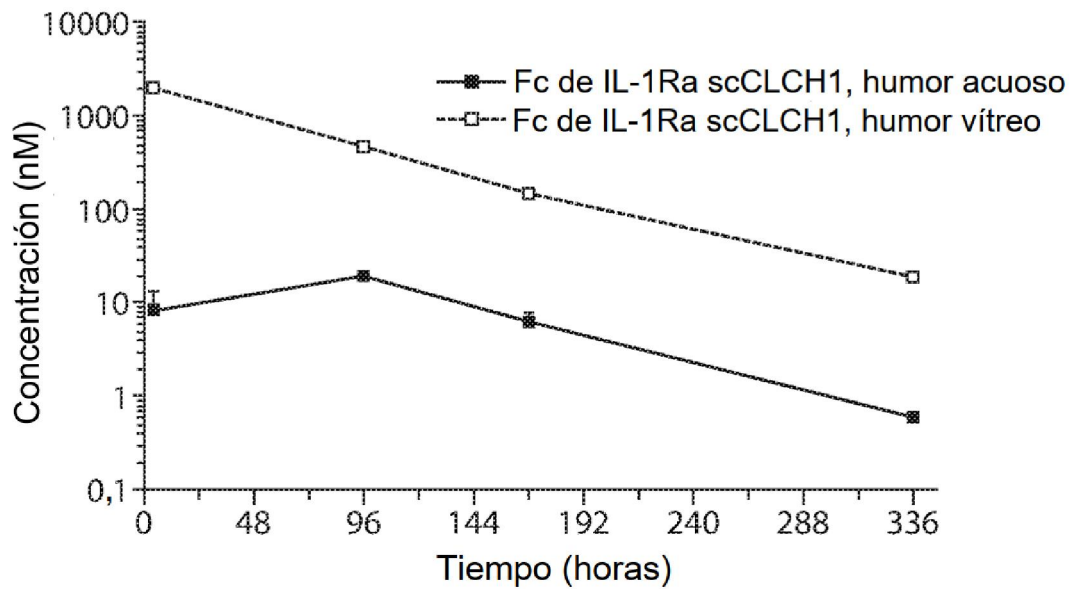


FIG. 11

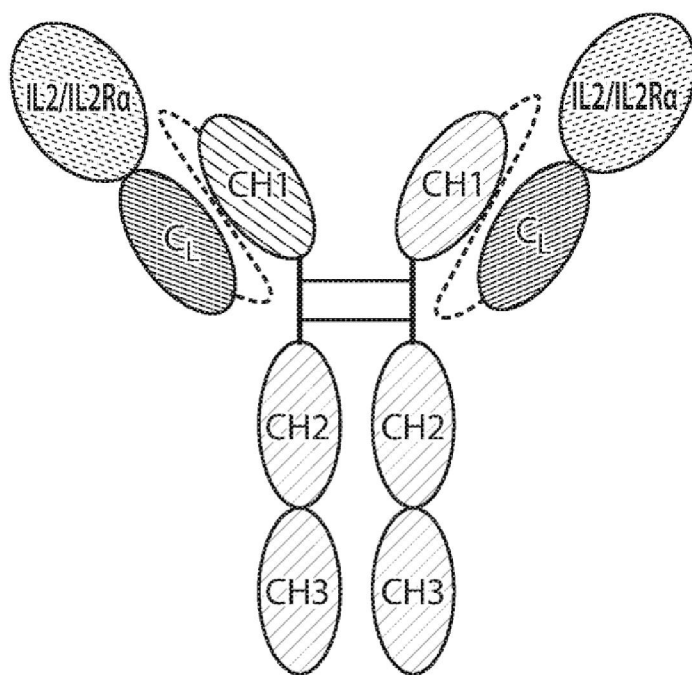


FIG. 12A

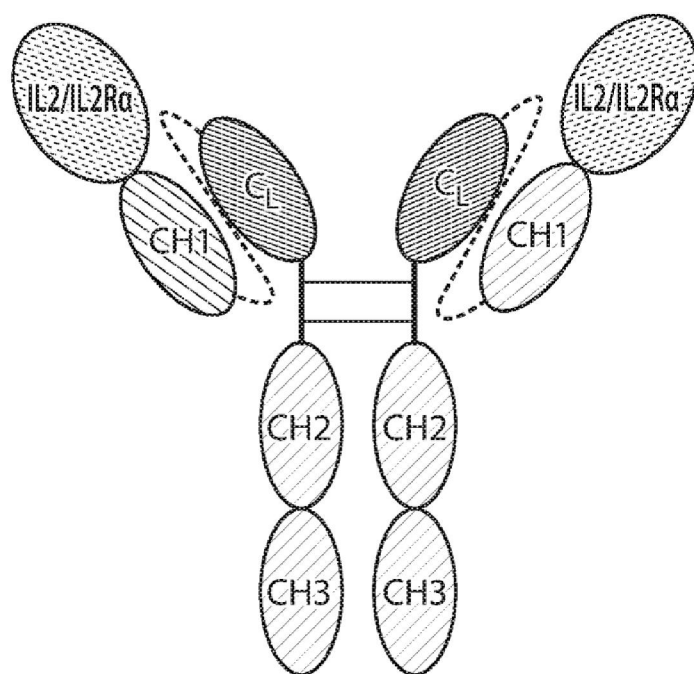


FIG. 12B

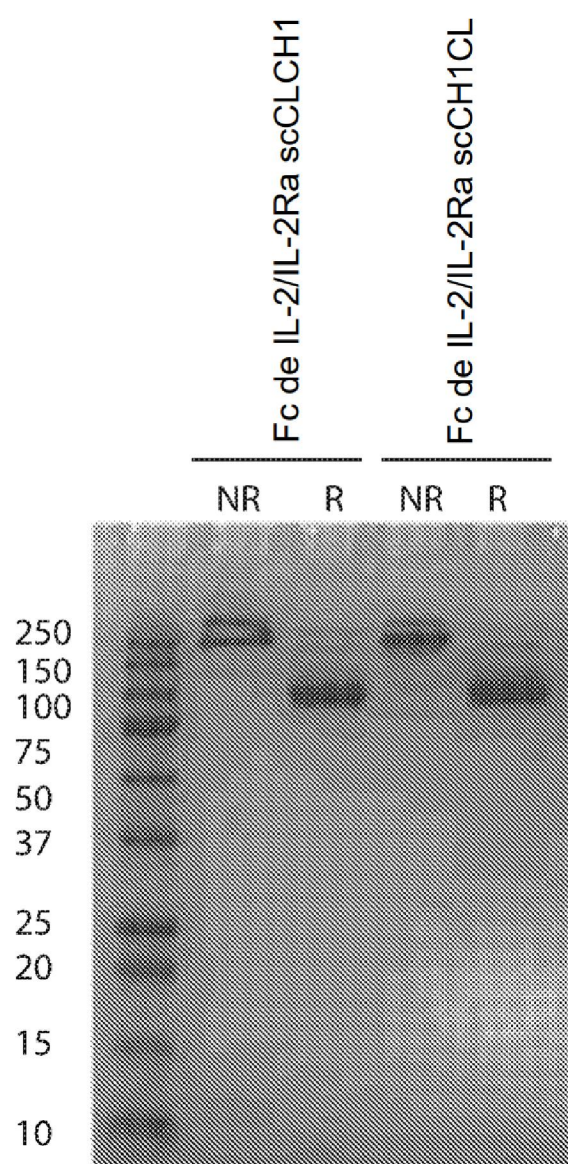


FIG. 13

Fc de IL-2/IL-2Ra scCLCLH1

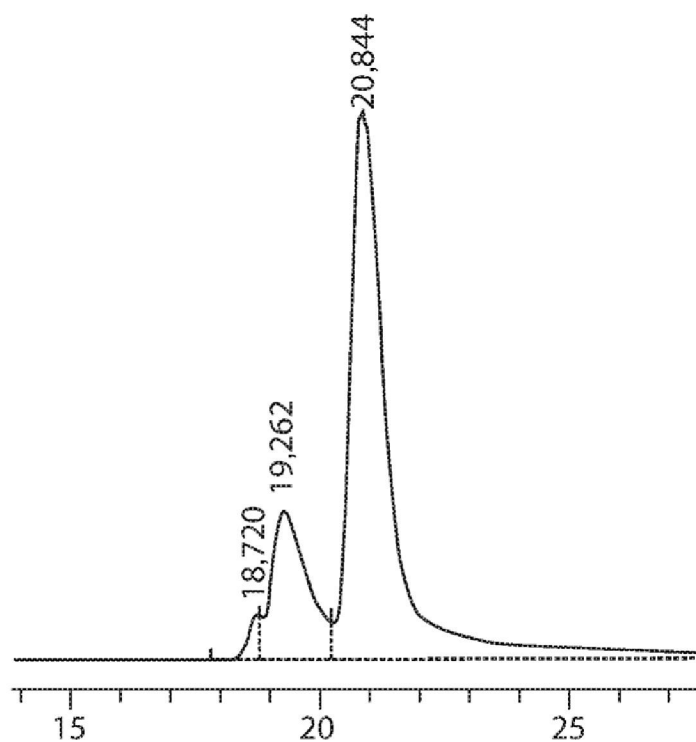


FIG. 14A

Fc de IL-2/IL-2Ra scCH1CL

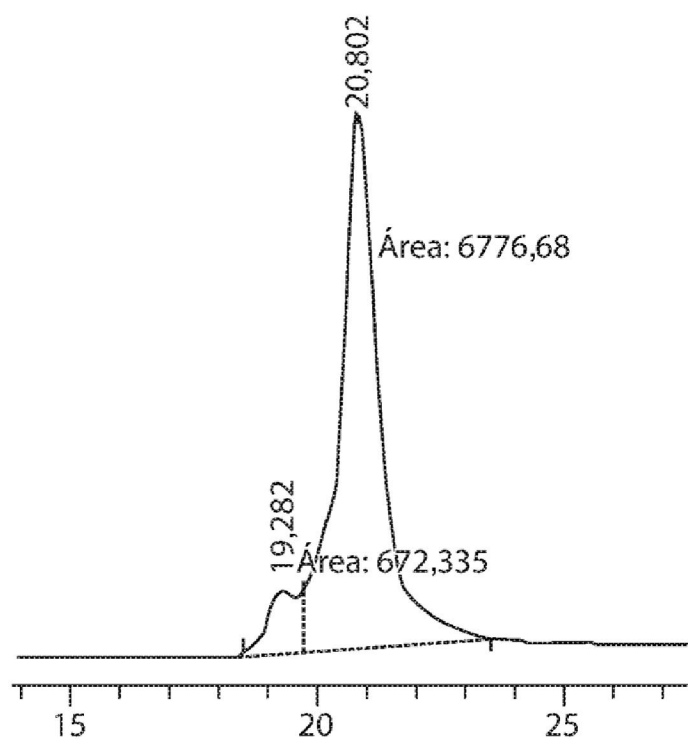


FIG. 14B

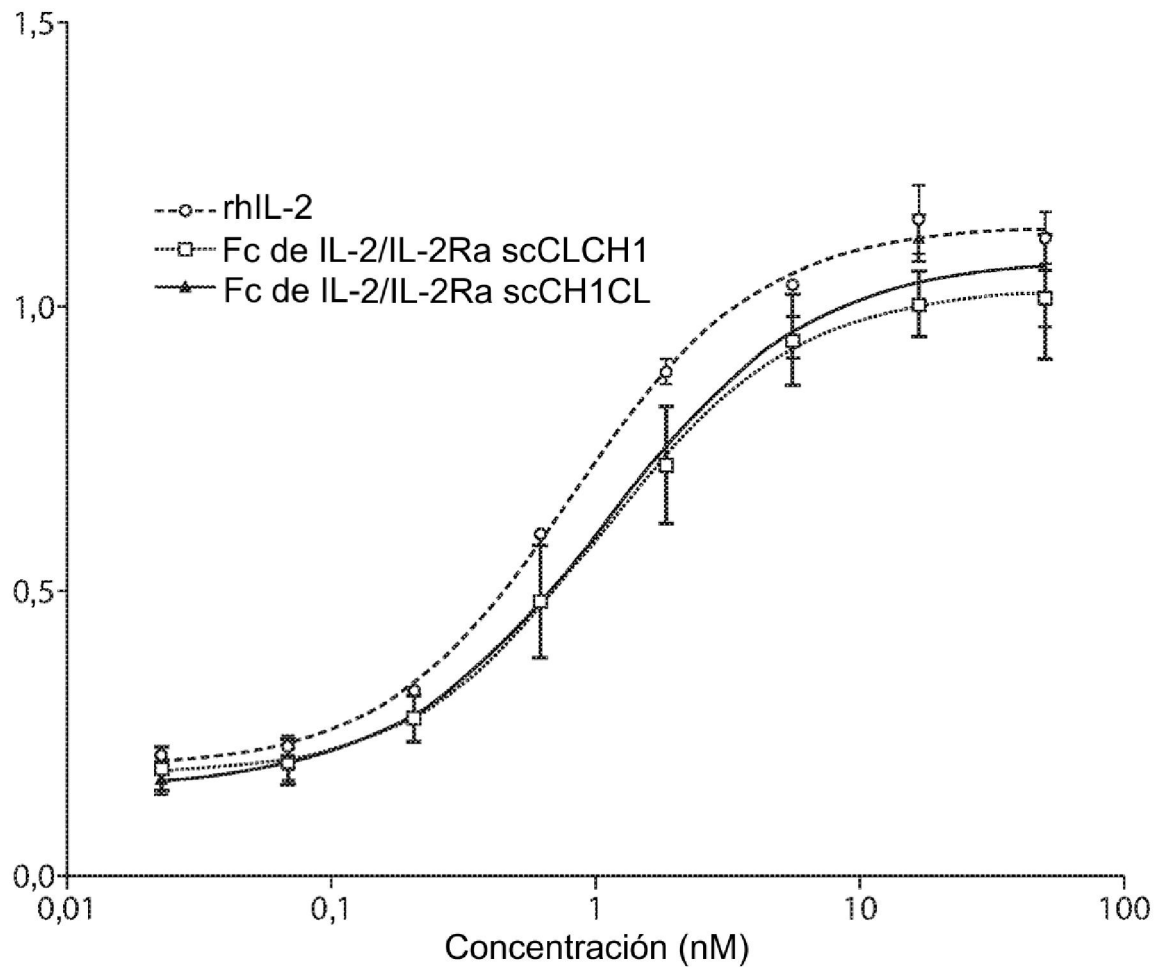
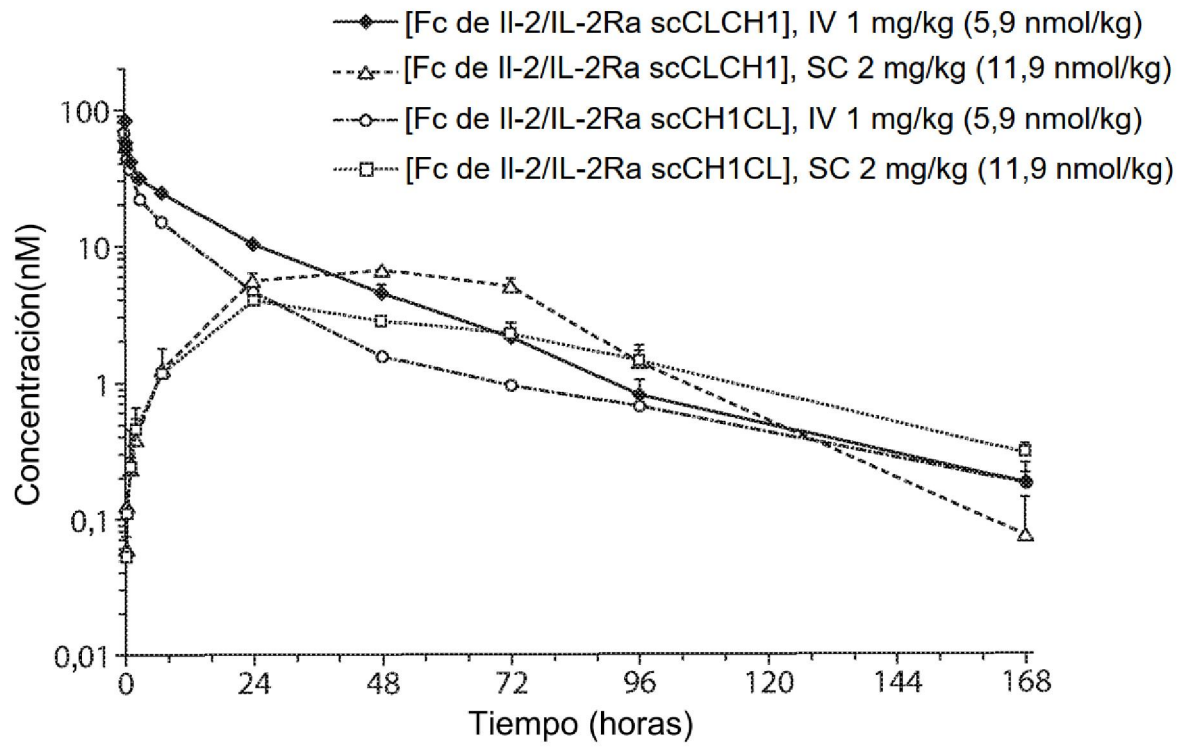


FIG. 15



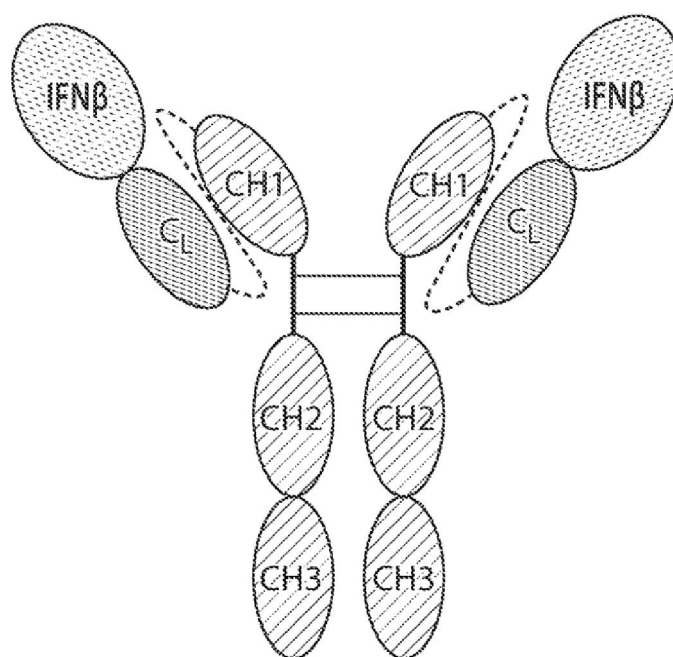


FIG. 17

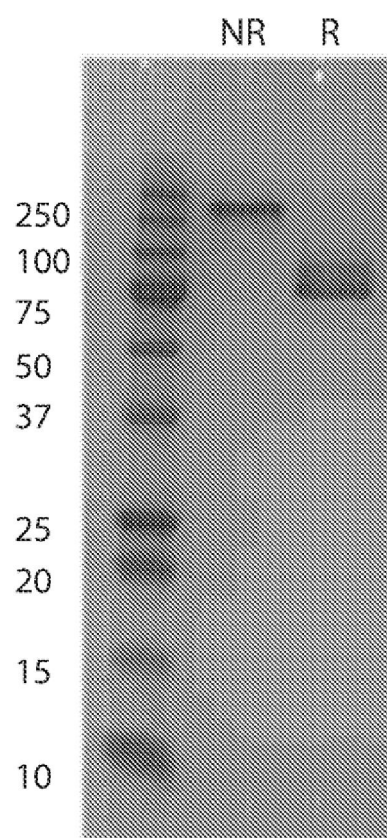


FIG. 18

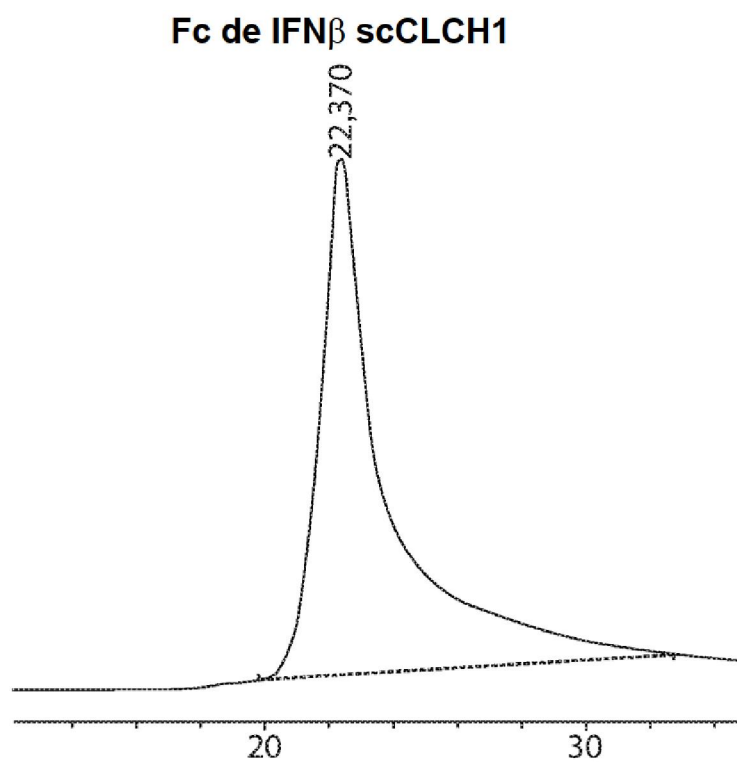


FIG. 19

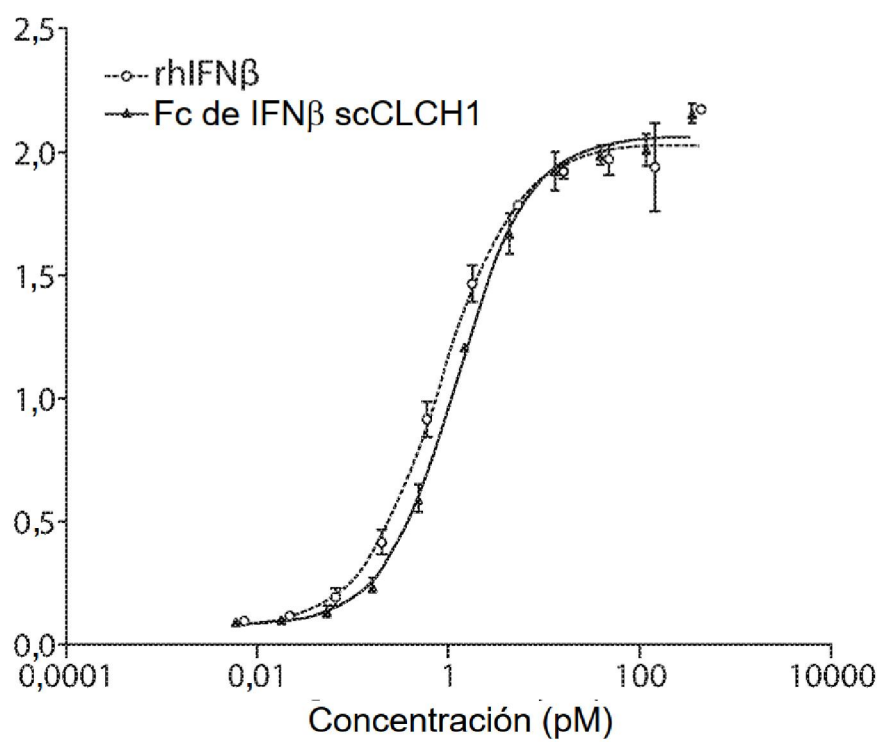
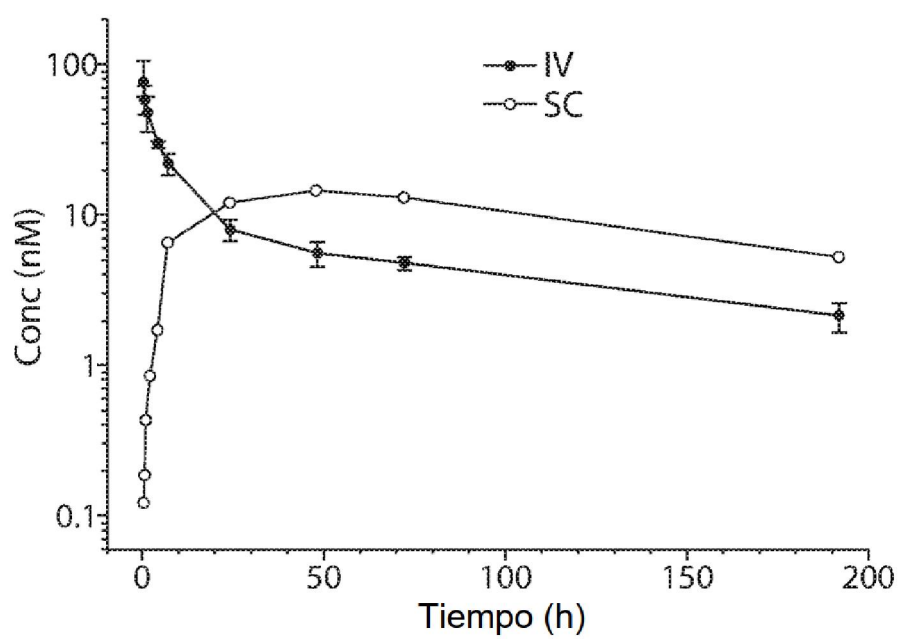


FIG. 20

Fc de IFNb scCLCH1**FIG. 21**

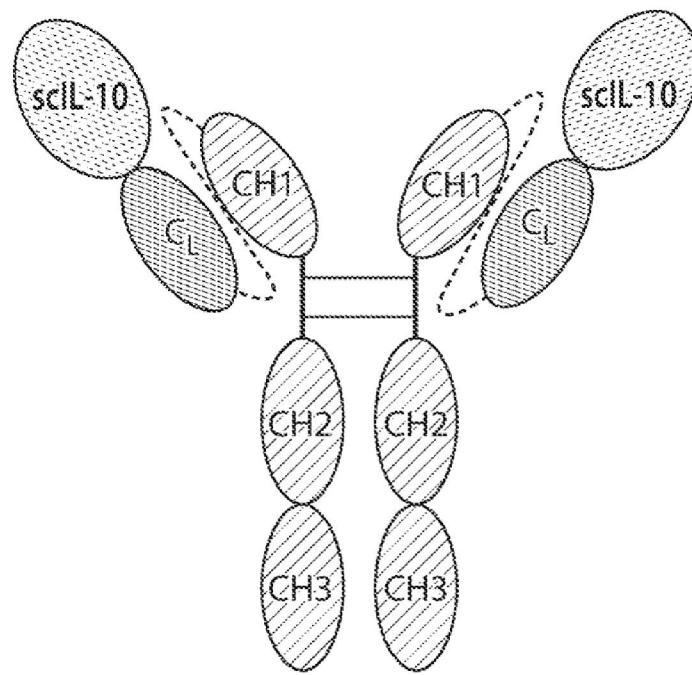


FIG. 22A

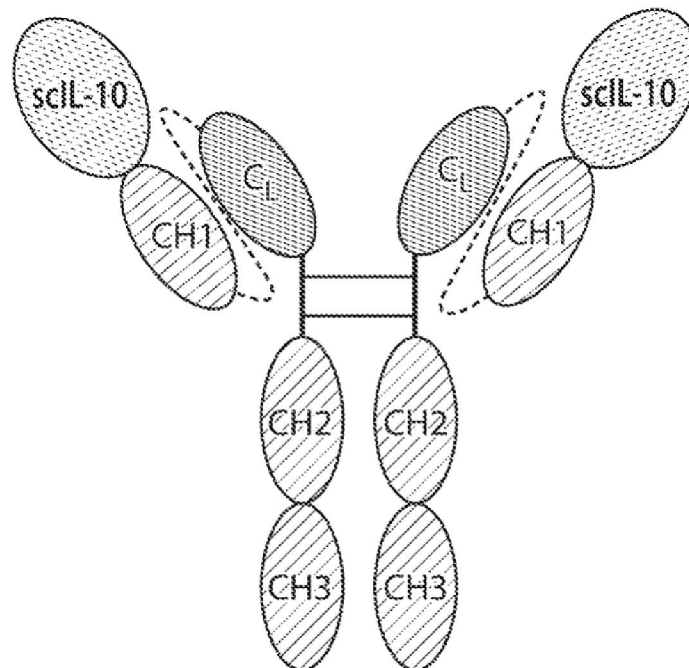


FIG. 22B

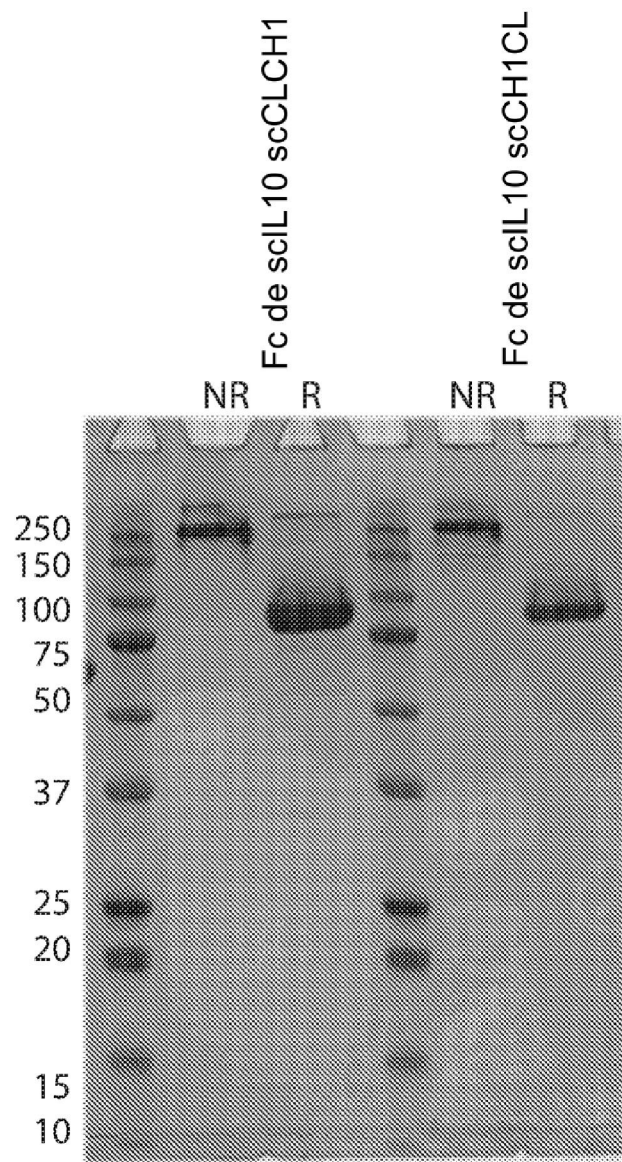


FIG. 23

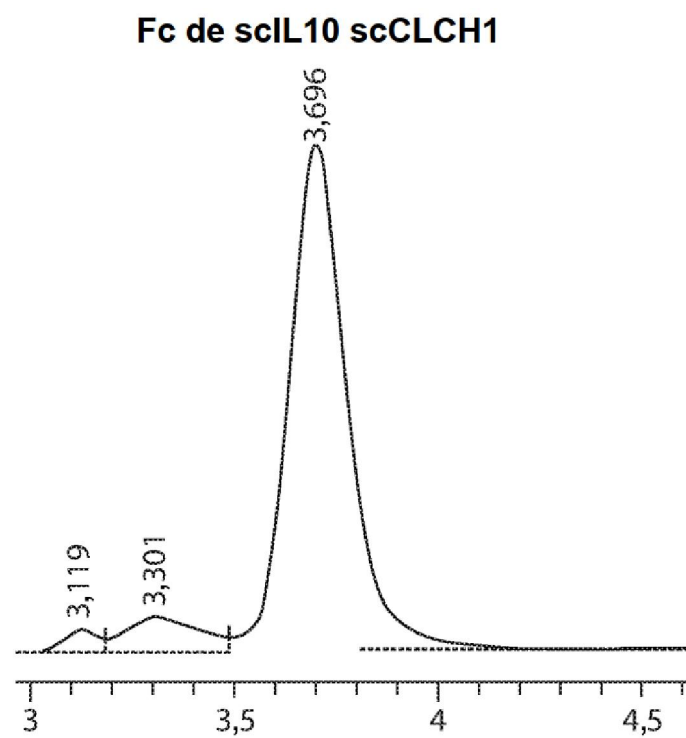


FIG. 24A

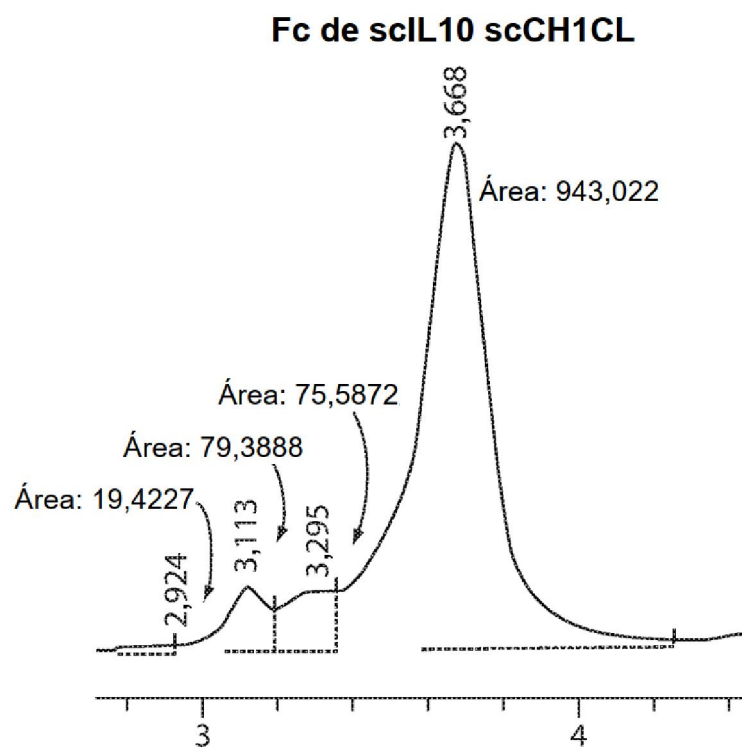


FIG. 24B

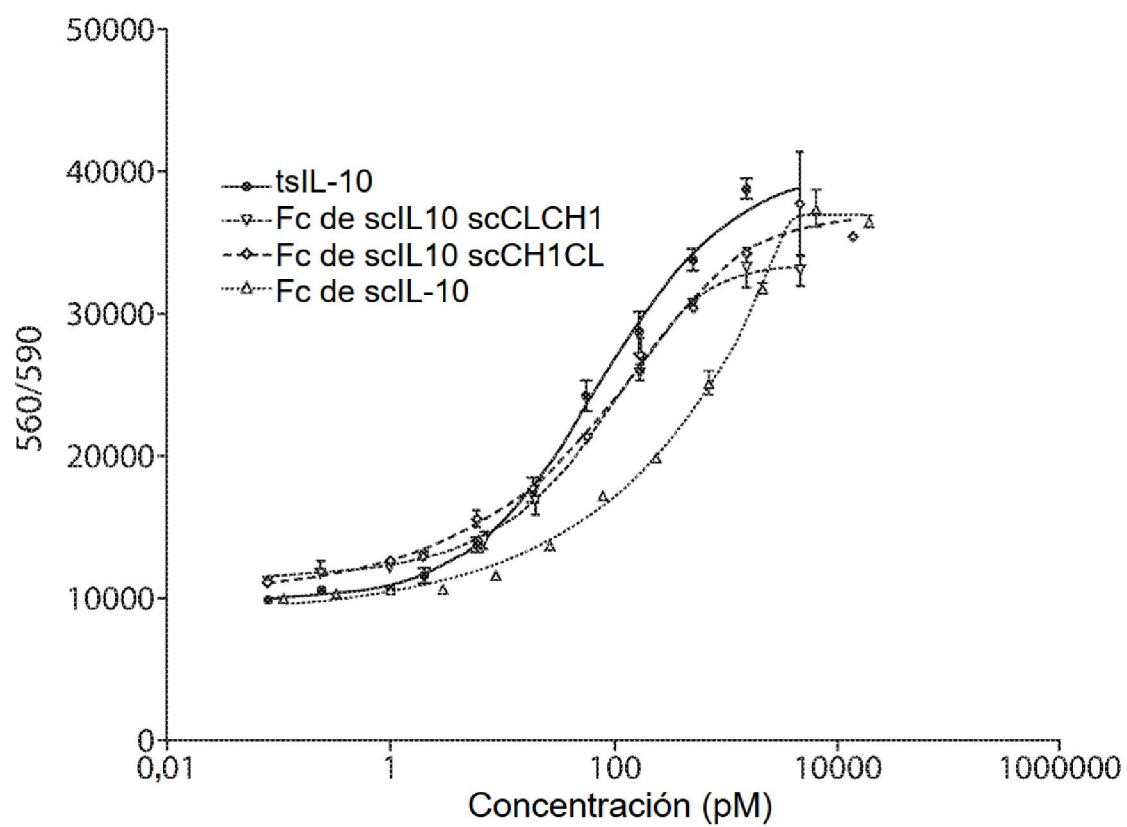


FIG. 25