(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 120 949**

(51) Int. Cl.[6]: **C07K 16/00**
C12N 15/62
A61K 38/00
A61K 39/395

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA REVISADA T4

(96) Número de solicitud europea: **91110307 .5**
(96) Fecha de presentación : **22.06.1991**
(97) Número de publicación de la solicitud: **0464533**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.1992**

(54) Título: **Proteínas de fusión con porciones de inmunoglobulinas, su preparación y empleo.**

(30) Prioridad: **28.06.1990 DE 4020607**

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.11.1998**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la traducción revisada BOPI: **29.12.2011**

(45) Fecha de publicación de la traducción revisada de patente europea: **29.12.2011**

(73) Titular/es:
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Titular al 50 %)
Bruningstrasse 50
Frankfurt am Main 65929, DE
The General Hospital Corporation (Titular al 50 %)

(72) Inventor/es: **Lauffer, Leander;**
Oquendo, Patricia;
Zettlmeissl, Gerd y
Seed, Brian

(74) Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 120 949 T4

Aviso: El presente folleto se publica en ejecución de sentencia.

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión con porciones de inmunoglobulinas, su preparación y empleo.

La invención se refiere al campo de las proteínas de fusión solubles obtenidas por tecnología genética, que se componen de proteínas humanas o partes de ellas no pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas, y de distintas porciones de la región constante de moléculas de inmunoglobulinas. Las propiedades funcionales de ambos copartícipes en la fusión se conservan sorprendentemente en la proteína de fusión.

Por los documentos de patentes europeas EP-A-0325262 y EP-A-0314317 se conocen proteínas de fusión correspondientes que se componen de distintos dominios de la proteína de membrana de CD4 de células T humanas y de porciones de IgG1 humana. Algunas de estas proteínas de fusión se unen con la misma afinidad a la glicoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana que a la molécula de CD4 unida a las células. La molécula de CD4 pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y como consecuencia en lo referente a su estructura terciaria está constituida muy similarmente a las moléculas de inmunoglobulinas. Esto es válido también para la cadena α del receptor del antígeno de células T, para la que asimismo se describieron tales fusiones (Gascoigne y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84 (1987), 2937-2940). Debido a la estructura muy similar de los dominios, era de esperar, por tanto, en este caso la conservación de la actividad biológica de ambos copartícipes en la fusión en la proteína de fusión.

En el documento de solicitud de patente europea nº 0417563 se describen secuencias de ADN que codifican una secuencia parcial de fragmentos solubles de proteínas no solubles, que se unen al factor de necrosis tumoral (TNF). Adicionalmente, también se menciona allí otra secuencia parcial que codifica todos los dominios, excepto el primer dominio de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas humanas, tales como IgG, IgA, IgM e IgE.

El documento de solicitud de patente europea publicada posteriormente nº 0418014, divulga en la página 8, líneas 18-25, moléculas de anticuerpos quiméricos, en las que únicamente los dominios variables de las moléculas de inmunoglobulinas hablan sido reemplazados por secuencias de TNF-R.

Un objeto de la invención son proteínas de fusión solubles que se componen de la porción extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral humano o de una parte funcional de éste y de una parte Fc de una molécula de inmunoglobulina, escogida entre una de las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE.

Las proteínas de fusión se pueden preparar en sistemas de expresión conocidos de procariontes o eucariontes, pero preferentemente en células de mamífero (p. ej., células CHO, COS y BHK).

Las proteínas de fusión de acuerdo con la invención son fáciles de purificar, debido a su porción de inmunoglobulina, mediante cromatografía de afinidad y poseen mejoradas propiedades farmacocinéticas *in vivo*.

En muchos casos, la parte Fe en la proteína de fusión es absolutamente ventajosa para el uso en terapia y diagnóstico y conduce así, por ejemplo, a propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP-A-0232262).

Existen distintas proteasas cuyo uso para este fin parece concebible. La papaína o la pepsina se emplean por ejemplo para la producción de fragmentos F(ab) a partir de inmunoglobulinas (Immunology, compilador Roitt, I. y col., Gower Medical Publishing, London (1989)), pero no se disocian de manera especialmente específica. El factor de coagulación de la sangre Xa, por el contrario, reconoce en una proteína la secuencia de tetrapéptido relativamente rara, Ile-Glu-Gly-Arg y realiza una disociación hidrolítica de la proteína detrás del resto de arginina. Las secuencias de disociación que contienen el tetrapéptido descrito, fueron introducidas por primera vez por Nagai y Thogersen en una proteína híbrida mediante tecnología genética (Nagai, K. y Thogersen, H.C., Nature, Vol. 309 (1984), 810-812). Estos autores pudieron demostrar que las proteínas expresadas en *E. coli* eran disociadas realmente de manera específica por el Factor Xa. Sin embargo, no se conoce a partir de publicaciones ningún ejemplo de que dichas proteínas se puedan expresar también en células eucariotas y en especial en células de animales y que se puedan separar del factor Xa después de su purificación. Sin embargo, ha de preferirse una expresión de las proteínas de acuerdo con la invención en células animales, ya que sólo en un tal sistema celular es de esperar la segregación de, por ejemplo, receptores que normalmente se encuentran en membranas, como copartícipes en la fusión manteniendo su estructura nativa y con ello su actividad biológica. La segregación en el material sobrenadante de cultivo celular facilita la subsiguiente purificación sencilla de la proteína de fusión.

La invención se refiere, por tanto, a proteínas de fusión solubles que se componen de la porción extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral humano o una parte funcional de éste, y de una parte Fe de una molécula de inmunoglobulina, elegida entre una de las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE.

En una forma de realización especial, la parte Fc se puede separar de manera sencilla mediante una secuencia de corte disociable conjuntamente incorporada en la estructura mediante el factor Xa.

Además, la invención se refiere a procedimientos para la preparación mediante tecnología genética de estas proteínas de fusión, así como a su uso para el diagnóstico y la terapia.

Los siguientes Ejemplos contribuyen a la explicación de la invención. No representan, sin embargo, ningún modo de realización de la invención.

Ejemplo 1

Proteínas de fusión de tromboplastina

La coagulación de la sangre es un proceso de importancia central en el organismo humano. Está regulada de manera correspondientemente fina la cascada de la coagulación, en la que cooperan una pluralidad de factores celulares y proteínas plasmáticas. La totalidad de estas proteínas (y de sus cofactores) se designan como factores de coagulación. Los productos finales de la cascada de la coagulación son trombina, que induce la agregación de las plaquetas, y fibrina, que estabiliza los trombos de plaquetas. La trombina cataliza la formación de fibrina a partir de fibrinógeno y se forma por sí misma mediante una proteolisis limitada de la protrombina. De este paso es responsable el factor X activado (factor Xa), que en presencia del factor Va y de iones de calcio se une a membranas de las plaquetas y disocia la protrombina.

Existen dos vías para la activación del factor X, la "trayectoria" extrínseca y la intrínseca. En la "trayectoria" intrínseca se activan una serie de factores mediante proteolisis, para formar en cada caso por sí mismos proteasas activas. En la "trayectoria" extrínseca, se sintetiza tromboplastina (factor tisular) en medida aumentada por células dañadas y ésta activa al factor X, junto con el factor VIIa y iones de calcio. Anteriormente se suponía que la actividad de la tromboplastina se limitaba a esta reacción. Sin embargo, el complejo de tromboplastina y factor VIIa interviene al nivel del factor IX, asimismo activando en la "trayectoria" intrínseca. Un complejo de tromboplastina y factor VIIa también es uno de los activadores fisiológicos más importantes de la coagulación sanguínea.

Es por ello concebible que la tromboplastina, aparte de su uso como agente de diagnóstico (véase más adelante), también se puede utilizar como componente de agentes terapéuticos para el tratamiento de deficiencias innatas o adquiridas en la coagulación sanguínea. Ejemplos de ellas son las hemofilias crónicas provocadas por un defecto de factores VIII, IX o XI, o también trastornos agudos de la coagulación sanguínea como consecuencia de, por ejemplo, enfermedades hepáticas o renales. También sería concebible el uso de tales agentes terapéuticos después de operaciones quirúrgicas.

La tromboplastina es una proteína de membrana integral, que no pertenece a la familia de las inmunoglobulinas. Las secuencias del ADNc de la tromboplastina se han publicado en total por cuatro grupos (Fisher y col., Thromb. Res., vol. 48 (1987), 89-99; Morrisey y col., Cell, vol. 50 (1987), 129-135; Scarpati y col., Biochemistry, vol. 26 (1987), 5234-5238; Spicer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 84 (1987), 5148-5152). El ADNc de la tromboplastina contiene un cuadro de lectura abierto, que codifica un polipéptido formado por 295 restos de aminoácidos, de los cuales los 32 aminoácidos N-terminales funcionan como péptido de señal. La tromboplastina madura se compone de 263 restos de aminoácidos y posee una estructura con tres dominios: i) el dominio extracelular amino-terminal (219 restos de aminoácidos); ii) la región transmembranal (23 restos de aminoácidos); y iii) el dominio citoplasmático (carboxi-terminal; 21 restos de aminoácidos). En el dominio extracelular existen tres sitios potenciales para la N-glicosilación (Asn-X-Thr). La tromboplastina está normalmente glicosilada, pero la glicosilación no parece ser esencial para la actividad de la proteína (Paborsky y col., Biochemistry, vol. 28 (1989), 8072-8077).

La tromboplastina es necesaria como aditivo a muestras de plasma en el diagnóstico de la coagulación sanguínea. Mediante la determinación en una sola etapa del tiempo de coagulación de la protrombina (p. ej., ensayo Quick) se puede determinar el estado de coagulación de la persona investigada. La tromboplastina necesaria para el diagnóstico se obtiene actualmente a partir de tejido humano, siendo difícilmente normalizable el procedimiento de preparación, el rendimiento es bajo y se tienen que poner a disposición cantidades considerables de material de partida humano (placentas). Por otro lado, es de esperar que también plantee problemas la preparación mediante tecnología genética de tromboplastina nativa, unida a membranas, condicionado por procesos complejos de purificación. Estas problemáticas se pueden evitar mediante la fusión conforme con la invención con porciones de inmunoglobulinas.

Las proteínas de fusión de tromboplastina conformes a la invención son sacadas de células de mamífero (p. ej., células CHO, BHK, COS) al medio de cultivo, purificadas mediante cromatografía de afinidad a proteína-A-Sepharose y poseen sorprendentemente una alta actividad en la determinación en una etapa del tiempo de coagulación de la protrombina.

Clonación del ADNc de tromboplastina

Para la clonación del ADNc de tromboplastina se utilizó la secuencia publicada por Scarpati y col., Biochemistry, vol. 26 (1987), 5234-5238. A partir de ésta se dedujeron dos moléculas de sondas de oligonucleótidos (véase la Fig. 1). Con estas dos moléculas de sondas se escrutó una genoteca de ADNc procedente de placenta humana (Grundmann y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83 (1986), 8024-8028).

Se obtuvieron clones de ADNc de distintos tamaños. Un clon, 2b-Apr5, que se emplea para el proceso ulterior, codifica la misma secuencia de aminoácidos que el ADNc descrito por Scarpati y col. En la Fig. 2 se representa la secuencia completa del clon 2b-Apr5 con la secuencia de aminoácidos de la tromboplastina deducida a partir de éste.

Construcción de una proteína de fusión de tromboplastina que codifica el plásmido híbrido pTF1Fc

El plásmido pCD4E gamma 1 (documento EP-0325262-A2; depositado en la ATCC con el número nº 67610) sirve para la expresión de una proteína de fusión a base del receptor CD4 humano y de IgG1 humana. La secuencia de ADN que codifica los dominios extracelulares de CD4 se retira de este plásmido con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Con la enzima HindIII se puede realizar en este caso sólo una disociación parcial, para cortar solamente en uno de los dos sitios para HindIII contenidos en el pCD4E gamma 1 (posición 2198). Se presenta entonces un vector abierto, en el que una secuencia reguladora de la transcripción eucariótica (promotor) está seguida por el sitio para HindIII abierto. El sitio para BamHI abierto está situado al comienzo de las regiones codificadoras de un enlazador pentapeptídico, seguido por los dominios Hinge, CH2 y CH3 de la IgG1 humana. El cuadro de lectura en la secuencia de reconocimiento por BamHI, GGATCC, es tal que se traduce GAT como ácido aspártico. La amplificación del ADN con polimerasa de ADN termoestable posibilita modificar una secuencia dada de manera tal que en uno o ambos de los extremos se adosen secuencias arbitrarias. Se sintetizaron dos oligonucleótidos, que se pueden hibridar con las secuencias en la región 5' no traducida (A: 5' GATCGATTAAGCTTCGGAACCCGCTCGATCTCGCCGCC 3') o la región codificadora (B: 5' GCATATCTGGATCCCCGTAGAATATTTCTCTGAATTCCCC 3') del ADNc de la tromboplastina. El oligonucleótido A es en tal caso parcialmente homólogo con la secuencia de la hebra codificadora, el oligonucleótido B es parcialmente homólogo con la hebra no codificadora; compárese la Fig. 3.

Después de haberse efectuado la amplificación, se presenta por lo tanto un fragmento de ADN (de 827 pb), que (referido a la hebra codificadora) contiene en el extremo 5' antes del comienzo de la secuencia codificadora un sitio para HindIII, y en el extremo 31 contiene después del codón para los tres primeros restos de aminoácidos de la región transmembranal, un sitio para BamHI. El cuadro de lectura en el sitio de corte con BamHI es tal que, después de ligación con el sitio para BamHI en pCD4E gamma 1, se consigue una fusión de genes con un cuadro de lectura continuo que va desde el codón de iniciación del ADNc de la tromboplastina hasta el codón de detención de la cadena pesada de IgG1. El fragmento deseado se obtuvo y, después de tratamiento con HindIII y con BamHI, se ligó en el vector pCD4E gamma 1, descrito anteriormente, cortado con HindIII. (parcialmente) /BamHI. El plásmido resultante recibió el nombre de pTF1Fc (Fig. 4).

Transfacción de pTF1Fc en células de mamífero

La proteína de fusión codificada por el plásmido pTF1Fc se denomina de aquí en adelante TF1Fc. La TF1Fc se expresó transitoriamente en células COS. Para ello se transfectaron con pTF1Fc células COS con ayuda de DEAE-dextrano (documento EP-A-0325262).

Investigaciones indirectas con inmunofluorescencia dieron como resultado aproximadamente un 25% como proporción de células transfectadas. 24 h después de la transfección, las células se transfirieron a un medio exento de suero. Este material sobrenadante de células se recogió después de otros tres días más.

Purificación de la proteína de fusión TF1Fc a partir de materiales sobrenadantes de cultivos celulares

170 ml de material sobrenadante de células COS transfectadas transitoriamente, se recogieron durante una noche, en un proceso discontinuo a 4ºC, en una columna con 0,8 ml de proteína A-Sepharose, se lavaron con 10 volúmenes de tampón de lavado (tampón Tris 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM) y se eluyeron en fracciones de 0,5 ml con tampón de elución (en mezcla de ácido cítrico 100 mM: citrato sódico 100 mM 93:7). Las 9 primeras fracciones se reunieron después de una neutralización inmediata, en cada caso con 0,1 ml de tampón Tris 2 M, pH 8,6, y la proteína obtenida se transfirió mediante tres ciclos de concentración y dilución a un microconcentrador de Amicon (Centricon 30) en tampón TNE (tampón Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM). La TF1Fc así obtenida es pura según electroforesis en el SDS-PAGE (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). En ausencia de agente de reducción, se comporta en el SDS-PAGE igual que un dímero (aproximadamente con 165 kDa).

Actividad biológica de TF1Fc purificada en la determinación del tiempo de coagulación de la protrombina

La proteína de fusión TF1Fc es activa en concentraciones bajas (> 50 ng/ml) para la determinación en una sola etapa del tiempo de coagulación de la protrombina (Vinazzer, H., Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslabor (1979), Fisher Verlag, Stuttgart). Los tiempos de coagulación obtenidos son comparables con los tiempos de coagulación que se obtienen con una tromboplastina, que había sido aislada a partir de placenta humana.

Ejemplo 2

Proteínas de fusión del receptor de interleuquina-4

La interleuquina-4 (IL-4) es sintetizada por células T y se denominó originalmente factor de crecimiento de células B puesto que puede estimular la proliferación de células B. Ejerce una multitud de efectos sobre estas células. En especial, éstos son incitación de la síntesis de moléculas de las subclases de inmunoglobulinas IgG1 e IgE en células B activadas (Coffmann y col., Immunol. Rev., vol. 102 (1988) 5). Además de ello, la IL-4 regula también la proliferación y la diferenciación de células T y otras células hematopoyéticas. Contribuye por consiguiente a la regulación de reacciones alérgicas y otras reacciones inmunológicas. La IL-4 se une con alta afinidad a un receptor específico. El ADNc, que codifica el receptor de la IL-4 humana, se aisló (Idzerda y col., J. Exp. Med., vol. 171 (1990) 861-873).

A partir del análisis de la secuencia de aminoácidos, derivada de la secuencia de ADNc, se desprende que el receptor de IL-4 se compone en total de 825 aminoácidos, actuando los 25 aminoácidos del extremo N-terminal como péptido de señal. El receptor de IL-4 humano maduro se compone de 800 aminoácidos y posee, como la tromboplastina, una estructura con tres dominios: i) el dominio extracelular amino-terminal (207 aminoácidos); ii) la región transmembranal (24 aminoácidos) y iii) el dominio citoplasmático (569 aminoácidos). En el dominio extracelular existen seis sitios potenciales para N-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser). El receptor de IL-4 posee homologías con el receptor de IL-6 humano, con la subunidad β del receptor de IL-2 humano, con el receptor de eritropoyetina de ratón y con el receptor de prolactina de rata (Idzerda y col., véase cita anterior). Por ello, igual que la tromboplastina, no es ningún miembro de la familia de las inmunoglobulinas, sino que se incluye, junto con las proteínas homologas mencionadas, en la nueva familia de los receptores de hematopoyetina. Son miembros de esta familia 4 restos de cisteína y una secuencia conservada que se encuentra próxima a la región transmembranal (Trp-Ser-X-Trp-Ser) en el dominio extracelular.

Debido a la función descrita del sistema de IL-4 y receptor de IL-4, es posible un uso terapéutico de una forma recombinante del receptor de IL-4 para la represión de reacciones inmunes mediadas por IL-4 (p. ej., reacción de rechazo de trasplantes, enfermedades autoinmunitarias, reacciones alérgicas).

Las cantidades de la sustancia, necesarias para una terapia hacen esencial una preparación de tales moléculas por tecnología genética. De acuerdo con la invención, la síntesis de formas solubles del receptor de IL-4 en forma de proteína de fusión de inmunoglobulinas es especialmente ventajosa, debido a la purificación sin problemas mediante cromatografía de afinidad y a las propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Las proteínas de fusión del receptor de IL-4 son sacadas por células de mamífero (p. ej., células CHO, BHK, COS) al medio de cultivo, purificadas mediante cromatografía de afinidad con la proteína A-Sepharose y poseen sorprendentemente propiedades funcionales idénticas a las de los dominios extracelulares de la molécula intacta del receptor de IL-4, unida a membranas.

Construcción de un plásmido híbrido, pIL-4RFc, que codifica la proteína de fusión del receptor de IL-4

Si el plásmido pCD4EGammal se corta con XhoI y BamHI se presenta un vector abierto, en el que el sitio abierto para XhoI se encuentra "aguas abajo" de la secuencia del promotor. El sitio abierto BamHI está al comienzo de las regiones codificadoras de un enlazador pentapeptídico, seguido por los dominios Hinge y CH2 y CH3 de la IgG1 humana. El cuadro de lectura en la secuencia de reconocimiento por BamHI, GGATCC, es tal que se traduce GAT como ácido aspártico. La amplificación del ADN con polimerasa de ADN termoestable, facilita modificar una secuencia dada de tal modo que se pueden adosar secuencias arbitrarias en uno o ambos extremos. Se sintetizaron dos oligonucleótidos, que se pueden hibridar con las secuencias en la región 5' no traducida (A: 5' GATCCAGTACTCGAGAGA GAAGCCGGGCGTGGTGGCTCATGC 3') o bien en la región codificadora (B: 5' CTATGACATGGATCCTGCTC GAAGGGCTCCCTGTAGGAGTTGTG 3') del ADNc del receptor de IL-4, que se presenta clonado en el vector pDC302/T22-8 (Idzerda y col., véase cita anterior). El oligonucleótido A es en tal caso parcialmente homólogo con la secuencia de la hebra codificadora, y el oligonucleótido B es parcialmente homólogo con la hebra no codificadora; compárese la Fig. 5. Después de haberse efectuado la amplificación mediante una polimerasa de ADN termoestable, se presenta un fragmento de ADN (de 836 pb) que referido a la hebra codificadora, en el extremo 5' contiene antes del comienzo de la secuencia codificadora, un sitio para XhoI y en el extremo 3' contiene antes del último codón del dominio extracelular, un sitio para BamHI. El cuadro de lectura en el sitio de corte con BamHI es tal que, después de ligación con el sitio para BamHI en pCD4E gamma 1, se consigue una fusión de genes con un cuadro de lectura continuo que va desde el codón de iniciación del ADNc del receptor de IL-4 hasta el codón de detención de la cadena pesada de IgG1. El fragmento deseado se obtuvo y, después de tratamiento con XhoI y BamHI, se ligó en el vector pCD4E gamma 1, descrito anteriormente, cortado con XhoI y BamHI. El plásmido resultante recibió el nombre de pIL4RFc (Fig. 6).

Transfección de pIL4RFc en células de mamífero

La proteína de fusión codificada por el plásmido pIL4RFc se denomina de aquí en adelante IL4RFc. La IL4RFC se expresó transitoriamente en células COS. Para ello se transfectaron con pIL4RFc células COS con ayuda de DEAE-dextrano (documento de patente europea EP-A-0325262). Las investigaciones indirectas con inmunofluorescencia dieron como resultado aproximadamente un 25% como proporción de células transfectadas. 24 h después de la transfección, las células se transfirieron a un medio exento de suero. Este material sobrenadante de células se recogió después de otros tres días más.

Purificación de la proteína de fusión IL4RFc a partir de materiales sobrenadantes de cultivos celulares

500 ml de material sobrenadante de células COS transfectadas transitoriamente se recogieron durante una noche, en un proceso discontinuo a 4ºC, en una columna con 1,6 ml de proteína-A-Sepharose, se lavaron con 10 volúmenes de tampón de lavado (tampón Tris 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM) y se eluyeron en fracciones de 0,5 ml con tampón de elución (en mezcla de ácido cítrico 100 mM y citrato sódico 100 mM 93:7). Las 9 primeras fracciones se reunieron después de una neutralización inmediata, en cada caso con 0,1 ml de tampón Tris 2 M, pH 8,6, y la proteína obtenida se transfirió mediante tres ciclos de concentración y dilución a un microconcentrador de Amicon (Centricon 30) en tampón TNE (tampón Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM). La IL4RFc así obtenida es pura según

electroforesis en el SDS-PAGE (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). En ausencia de agentes de reducción se comporta en el SDS-PAGE igual que un dímero (aproximadamente con 150 kDa).

Actividad biológica de IL4RFC purificada

La proteína IL4RFc se une con IL-4 marcada radiactivamente con ^{125}I con igual afinidad (KD =0,5 nM) que el receptor de IL-4 intacto, unido a membrana. Inhibe la proliferación del clon D de la línea celular CTLLHuIL-4RI dependiente de IL-4 (Idzerda y col., véase cita anterior) en concentraciones de 10-1000 ng/ml. Además de ello, se adecua sobresalientemente para el desarrollo de ensayos de unión a IL-4 puesto que se puede unir a través de su parte Fc a placas de microtitulación revestidas previamente p. ej. con IgG de conejo anti-humana y en esa forma se une asimismo con alta afinidad a sus ligandos.

Ejemplo 3

Proteínas de fusión de eritropoyetina

La eritropoyetina madura (EPO) es una glicoproteína compuesta por 166 aminoácidos, que es esencial para el desarrollo de eritrocitos. Estimula la maduración y la diferenciación terminal de células precursoras eritroideas. El ADNc para la EPO humana se clonó (documento EP-A-0267678) y codifica los 166 aminoácidos de la EPO madura y un péptido de señal de 22 aminoácidos que es esencial para la segregación. Con ayuda del ADNc se puede preparar EPO funcional recombinante en células de mamífero modificadas por tecnología genética y utilizarse clínicamente para la terapia de fenómenos anémicos de distinta génesis (p. e j., en insuficiencia renal aguda).

De acuerdo con la invención, la síntesis de EPO como proteína de fusión con inmunoglobulina es particularmente ventajosa debido a la purificación sin problemas y a las propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Construcción de un plásmido híbrido pEPOFc que codifica una proteína de fusión de eritropoyetina

Esta construcción se efectuó análogamente a la descrita en el Ejemplo 2 (apartado Construcción de un plásmido híbrido, pIL-4RFc, que codifica la proteína de fusión del receptor de IL-4). Se sintetizaron dos oligonucleótidos, que se pueden hibridar con secuencias próximas al codón de iniciación (A: 5' GATCGATCTCGAGATGGGGGTGCAC GAATGTCCTGCCTGGCTGTGG 3') o bien al codón de detención (B: 5' CTGGAATCGGATCCCCTGTCCTG CAGGCCTCCCCTGTGTACAGC 3') del ADNc de EPO clonado en el vector pCES (documento EP-A-0267678). El oligonucleótido A es en este caso parcialmente homólogo con la secuencia de la hebra codificadora, y el oligonucleótido B es parcialmente homólogo con la hebra no codificadora; compárese la Fig. 7. Después de haberse efectuado la amplificación, mediante una polimerasa de ADN termoestable, se presenta un fragmento de ADN (de 598 pb) que, referido a la hebra codificadora, en el extremo 5' contiene antes del codón de iniciación un sitio para XhoI y en el extremo 3', se presenta el codón del penúltimo resto de aminoácido C-terminal de EPO (Asp), en una secuencia de reconocimiento con BamHI. El cuadro de lectura en el sitio de corte con BamHI es tal que, después de ligación con el sitio para BamHI en pCD4E gamma 1, se consigue una fusión de genes con un cuadro continuo de lectura que va desde el codón de iniciación del ADNc de EPO hasta el codón de detención de la cadena pesada de IgG1. El fragmento deseado se obtuvo y, después de tratamiento con XhoI y BamHI, se ligó en el vector pCD4E gamma 1, descrito anteriormente, cortado con XhoI/BamHI. El plásmido resultante recibió el nombre de pEPOFc (Fig. 8).

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión soluble que consiste en el segmento extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral humano o una parte funcional del mismo y en una parte necesaria de una molécula de inmunoglobulina seleccionada entre una de las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE.

2. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde el segmento de la molécula de inmunoglobulina está conectado a través de su región bisagra con la parte extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral.

3. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde el segmento de la molécula de inmunoglobulina consiste en la región constante de la cadena pesada de la IgG humana.

4. Una proteína de fusión según la reivindicación 3, en donde el segmento de la molécula de inmunoglobulina consiste en la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana o en un fragmento de la misma que se une a la proteína A.

5. Un procedimiento para preparar proteínas de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende introducir el ADN que codifica estas estructuras artificiales en un sistema de expresión celular de mamífero y, después de la expresión, purificar la proteína de fusión que se ha formado, mediante cromatografía de afinidad a través del segmento de inmunoglobulina.

6. El uso de las proteínas de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para el diagnóstico *in vitro*.

7. Una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, como agente farmacéutico.

Fig. 1

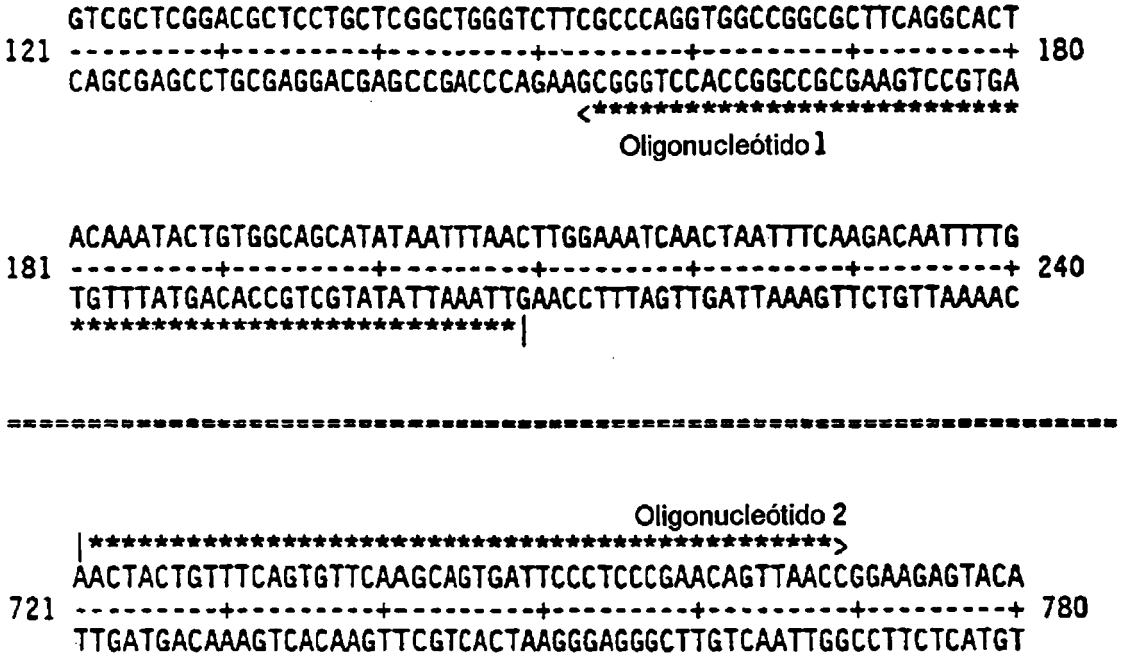

GTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGTCTTCGCCCAGGTGGCCGGCGCTTCAGGCACT
121
180
CAGCGAGCCTGCGAGGACGAGCCGACCCAGAAGCGGGTCCACCGGCCGCGAAGTCCGTGA
Oligonucleótido 1
ACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTG
181
240
TGTTTATGACACCGTCGTATATTAAATTGAACCTTTAGTTGATTAAAGTTCTGTTAAAAC
Oligonucleótido 2
AACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTACA
721
780
TTGATGACAAAGTCACAAGTTCGTCACTAAGGGAGGGCTTGTCAATTGGCCTTCTCATGT

Fig. 2

```
        10                  30                  50
GCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTCTCGGCGAACCCC

        70                  90                  110
CTCGCACTCCCTCTGGCCGGCCCAGGGCGCCTTCAGCCCAACCTCCCCAGCCCCACGGGC

       130                 150                 170
GCCACGGAACCCGCTCGATCTCGCCGCCAACTGGTAGACATGGAGACCCCTGCCTGGCCC
                                               MetGluThrProAlaTrpPro

       190                 210                 230
CGGGTCCCGCGCCCCGAGACCGCCGTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGTCTTCGCC
ArgValProArgProGluThrAlaValAlaArgThrLeuLeuLeuGlyTrpValPheAla

       250                 270                 290
CAGGTGGCCGGCGCTTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTTGGAAA
GlnValAlaGlyAlaSerGlyThrThrAsnThrValAlaAlaTyrAsnLeuThrTrpLys

       310                 330                 350
TCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGTGGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACT
SerThrAsnPheLysThrIleLeuGluTrpGluProLysProValAsnGlnValTyrThr

       370                 390                 410
GTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAGACACA
ValGlnIleSerThrLysSerGlyAspTrpLysSerLysCysPheTyrThrThrAspThr

       430                 450                 470
GAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGGTC
GluCysAspLeuThrAspGluIleValLysAspValLysGlnThrTyrLeuAlaArgVal

       490                 510                 530
TTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAG
PheSerTyrProAlaGlyAsnValGluSerThrGlySerAlaGlyGluProLeuTyrGlu

       550                 570                 590
AACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAACAATTCAGAGT
AsnSerProGluPheThrProTyrLeuGluThrAsnLeuGlyGlnProThrIleGlnSer
```

Fig. 2 *(Continuación)*

```
       610                   630                   650
TTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGA
PheGluGlnValGlyThrLysValAsnValThrValGluAspGluArgThrLeuValArg

       670                   690                   710
AGGAACAACACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTATACACTT
ArgAsnAsnThrPheLeuSerLeuArgAspValPheGlyLysAspLeuIleTyrThrLeu

       730                   750                   770
TATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAAACACTAATGAGTTT
TyrTyrTrpLysSerSerSerSerGlyLysLysThrAlaLysThrAsnThrAsnGluPhe

       790                   810                   830
TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCC
LeuIleAspValAspLysGlyGluAsnTyrCysPheSerValGlnAlaValIleProSer

       850                   870                   890
CGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGG
ArgThrValAsnArgLysSerThrAspSerProValGluCysMetGlyGlnGluLysGly

       910                   930                   950
GAATTCAGAGAAATATTCTACATCATTGGAGCTGTGGTATTTGTGGTCATCATCCTTGTC
GluPheArgGluIlePheTyrIleIleGlyAlaValValPheValValIleIleLeuVal

       970                   990                  1010
ATCATCCTGGCTATATCTCTACACAAGTGTAGAAAGGCAGGAGTGGGGCAGAGCTGGAAG
IleIleLeuAlaIleSerLeuHisLysCysArgLysAlaGlyValGlyGlnSerTrpLys

      1030                  1050                  1070
GAGAACTCCCCACTGAATGTTTCATAAAGGAAGCACTGTTGGAGCTACTGCAAATGCTAT
GluAsnSerProLeuAsnValSer

      1090                  1110                  1130
ATTGCACTGTGACCGAGAACTTTTAAGAGGATAGAATACATGGAAACGCAAATGAGTATT

      1150                  1170                  1190
TCGGAGCATGAAGACCCTGGAGTTCAAAAAACTCTTGATATGACCTGTTATTACCATTAG
```

Fig. 2 (Continuación)

1210 1230 1250
CATTCTGGTTTTGACATCAGCATTAGTCACTTTGAAATGTAACGAATGGTACTACAACCA

1270 1290 1310
ATTCCAAGTTTTAATTTTTAACACCATGGCACCTTTTGCACATAACATGCTTTAGATTAT

1330 1350 1370
ATATTCCGCACTTAAGGATTAACCAGGTCGTCCAAGCAAAAACAAATGGGAAAATGTCTT

1390 1410 1430
AAAAAATCCTGGGTGGACTTTTGAAAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC

1450 1470 1490
TTGCTCTGTTGCCCAGGCTGGAGTGCAGTAGCACGATCTCGGCTCACTTGCACCCTCCGT

1510 1530 1550
CTCTCGGGTTCAAGCAATTGTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTGCGC

1570 1590 1610
ACTACCACGCCAAGCTAATTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATCTTGGC

1630 1650 1670
CAGGCTGGTCTTGAATTCCTGACCTCAGTGATCCACCCACCTTGGCCTCCCAAAGATGCT

1690 1710 1730
AGTATTATGGGCGTGAACCACCATGCCCAGCCGAAAAGCTTTTGAGGGGCTGACTTCAAT

1750 1770 1790
CCATGTAGGAAAGTAAAATGGAAGGAAATTGGGTGCATTTCTAGGACTTTTCTAACATAT

1810 1830 1850
GTCTATAATATAGTGTTTAGGTTCTTTTTTTTTTCAGGAATACATTTGGAAATTCAAAAC

1870 1890 1910
AATTGGGCAAACTTTGTATTAATGTGTTAAGTGCAGGAGACATTGGTATTCTGGGCAGCT

Fig. 2 (Continuación)

1930 1950 1970

TCCTAATATGCTTTACAATCTGCACTTTAACTGACTTAAGTGGCATTAAACATTTGAGAG

1990 2010 2030

CTAACTATATTTTTATAAGACTACTATACAAACTACAGAGTTTATGATTTAAGGTACTTA

2050 2070 2090

AAGCTTCTATGGTTGACATTGTATATATAATTTTTTAAAAAGGTTTTTCTATATGGGGAT

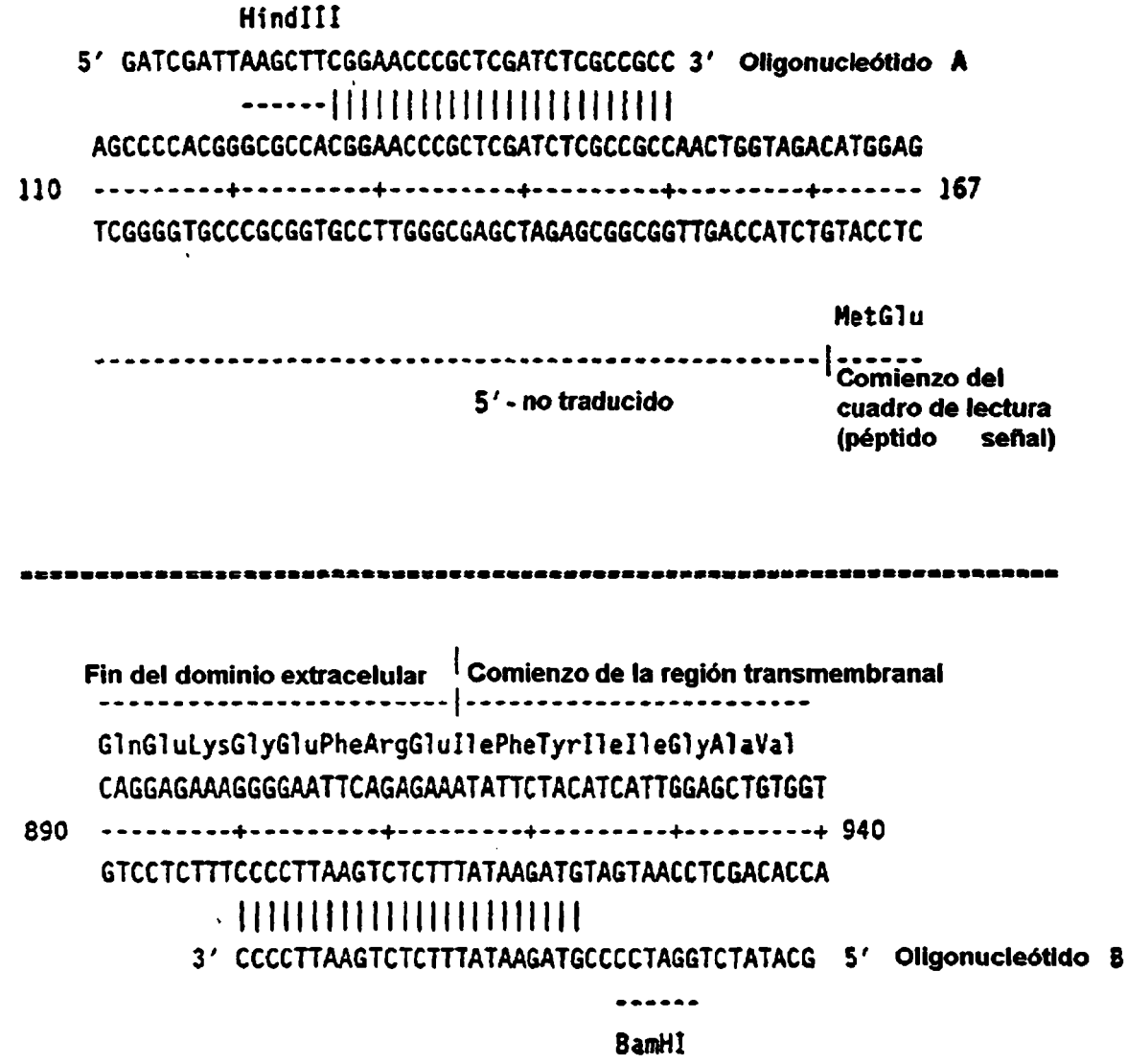
2110 2130 2150

TTTCTATTTATGTAGGTAATATTGTTCTATTTGTATATATTGAGATAATTTATTTAATAT

2170

ACTTTAAATAAAGGTGACTGGGAATTGTT

Fig. 3


HindIII
5' GATCGATTAAGCTTCGGAACCCGCTCGATCTCGCCGCC 3' Oligonucleótido A
AGCCCCACGGGCGCCACGGAACCCGCTCGATCTCGCCGCCAACTGGTAGACATGGAG
110
167
TCGGGGTGCCCGCGGTGCCTTGGGCGAGCTAGAGCGGCGGTTGACCATCTGTACCTC
MetGlu
5' - no traducido
Comienzo del cuadro de lectura (péptido señal)
Fin del dominio extracelular
Comienzo de la región transmembranal
GlnGluLysGlyGluPheArgGluIlePheTyrIleIleGlyAlaVal
CAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAAATATTCTACATCATTGGAGCTGTGGT
890
940
GTCCTCTTTCCCCTTAAGTCTCTTTATAAGATGTAGTAACCTCGACACCA
3' CCCCTTAAGTCTCTTTATAAGATGCCCCTAGGTCTATACG 5' Oligonucleótido B
BamHI

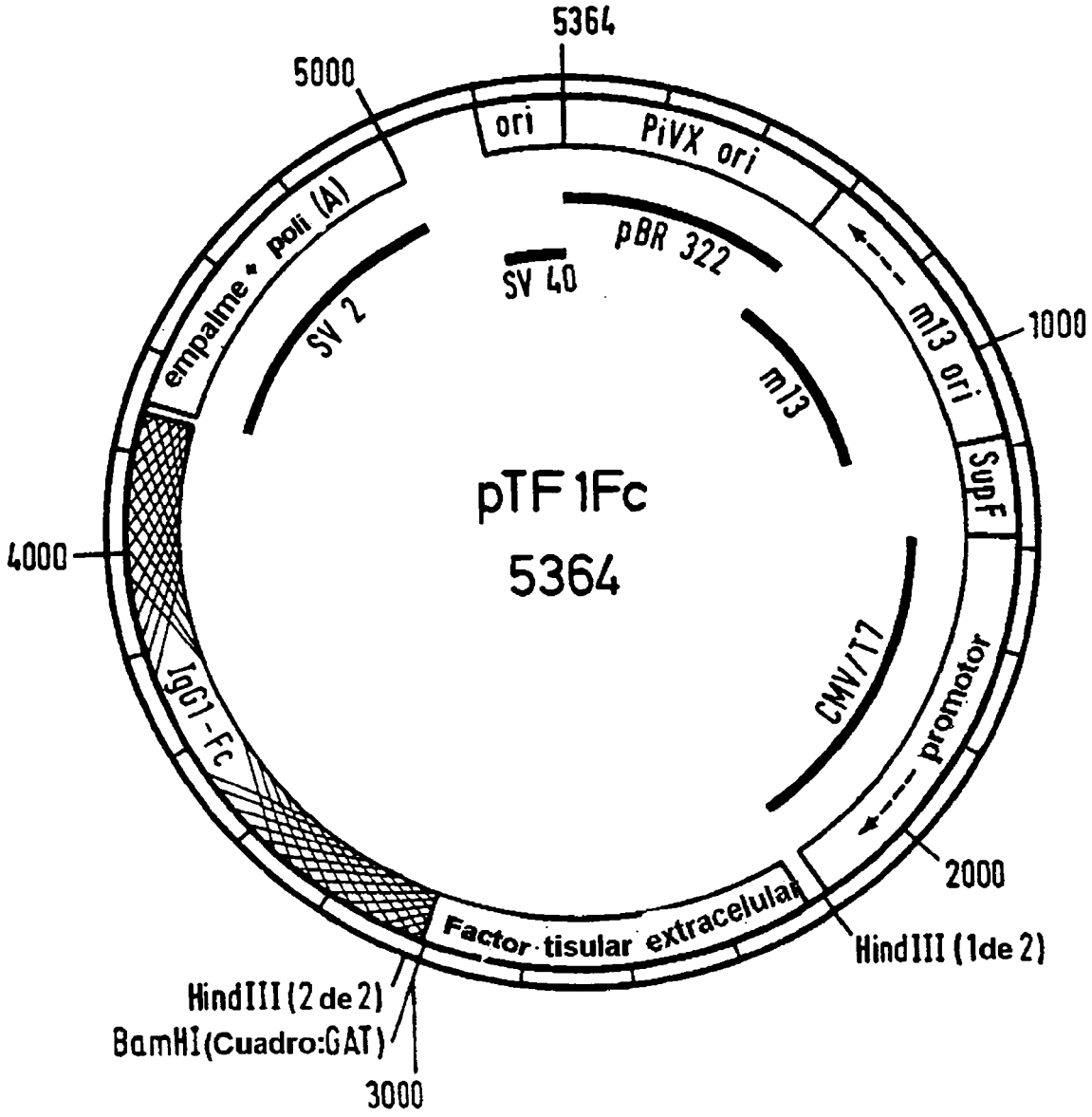
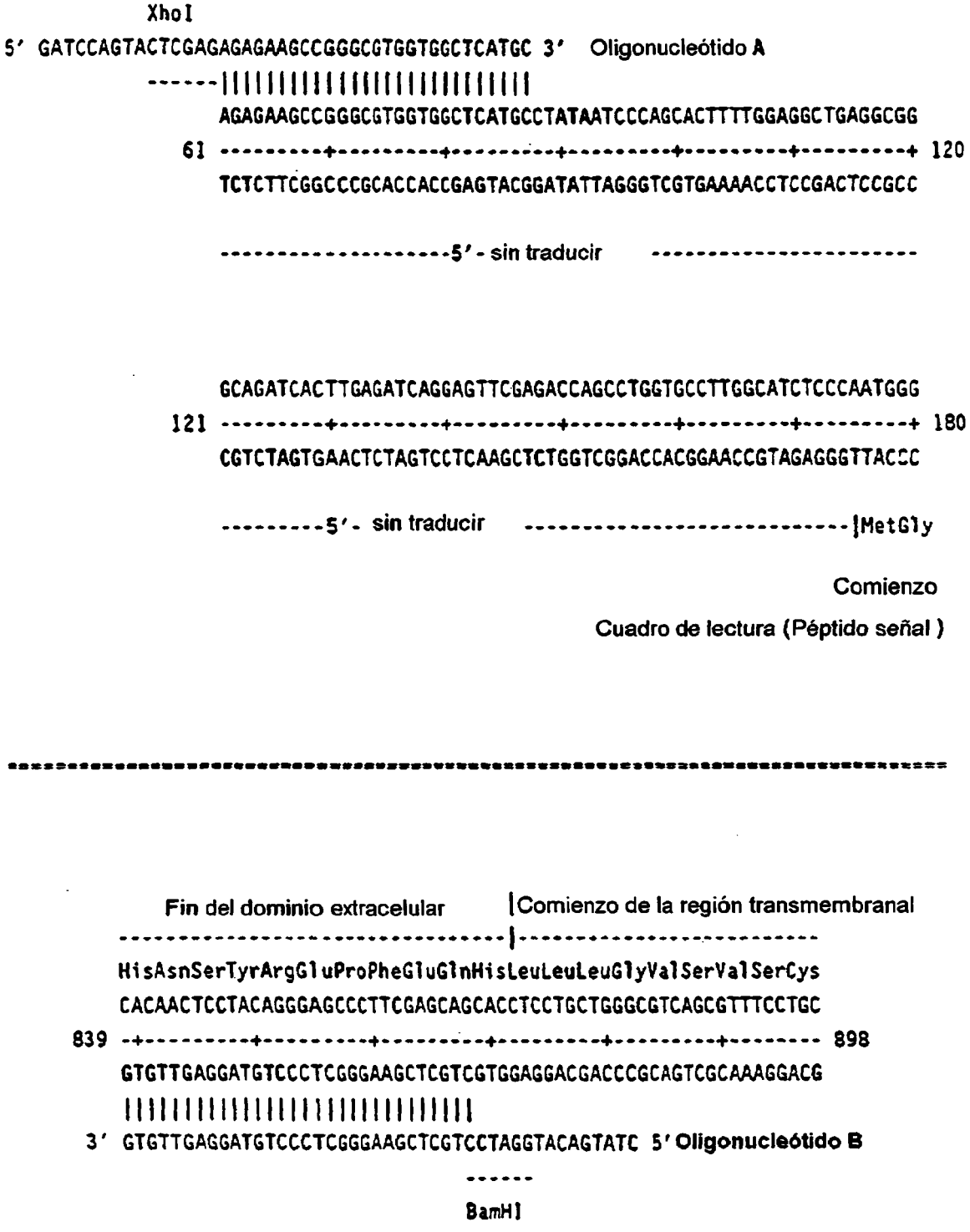

5364
5000
ori
PiVX ori
pBR 322
SV 40
SV 2
empalme + poli (A)
m13 ori
1000
m13
SupF
pTF 1Fc
5364
4000
CMV/17
promotor
IgG1-Fc
Factor tisular extracelular
2000
HindIII (1de 2)
HindIII (2 de 2)
BamHI (Cuadro:GAT)
3000

Fig. 4

Fig. 5


XhoI
5' GATCCAGTACTCGAGAGAGAAGCCGGGCGTGGTGGCTCATGC 3' Oligonucleótido A
AGAGAAGCCGGGCGTGGTGGCTCATGCCTATAATCCCAGCACTTTTGGAGGCTGAGGCGG
61
TCTCTTCGGCCCGCACCACCGAGTACGGATATTAGGGTCGTGAAAACCTCCGACTCCGCC
5'- sin traducir
GCAGATCACTTGAGATCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGTGCCTTGGCATCTCCCAATGGG
121
CGTCTAGTGAACTCTAGTCCTCAAGCTCTGGTCGGACCACGGAACCGTAGAGGGTTACCC
5'- sin traducir
MetGly
Comienzo
Cuadro de lectura (Péptido señal)
Fin del dominio extracelular
Comienzo de la región transmembranal
HisAsnSerTyrArgGluProPheGluGlnHisLeuLeuLeuGlyValSerValSerCys
CACAACTCCTACAGGGAGCCCTTCGAGCAGCACCTCCTGCTGGGCGTCAGCGTTTCCTGC
839
GTGTTGAGGATGTCCCTCGGGAAGCTCGTCGTGGAGGACGACCCGCAGTCGCAAAGGACG
3' GTGTTGAGGATGTCCCTCGGGAAGCTCGTCCTAGGTACAGTATC 5' Oligonucleótido B
BamHI

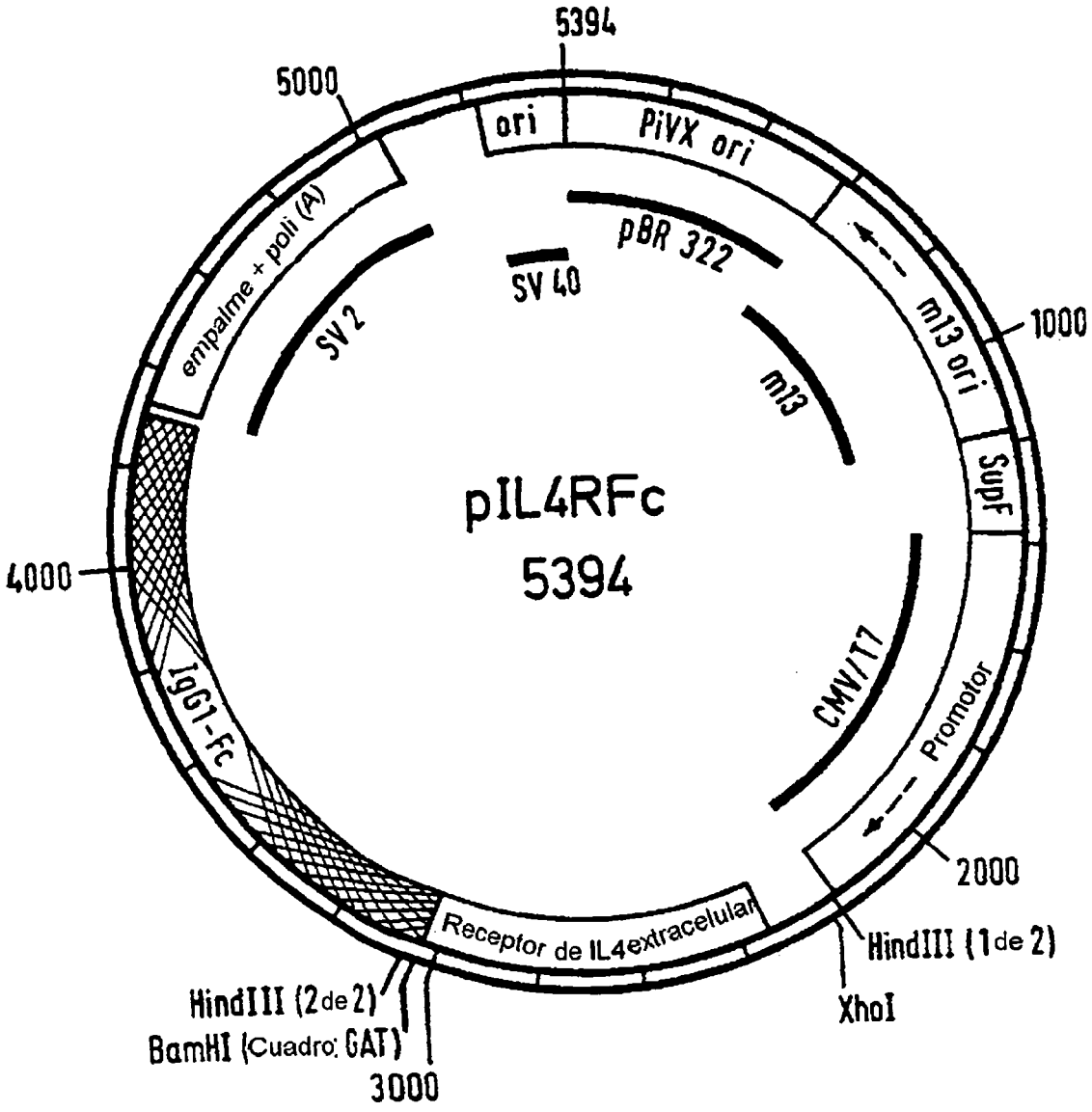
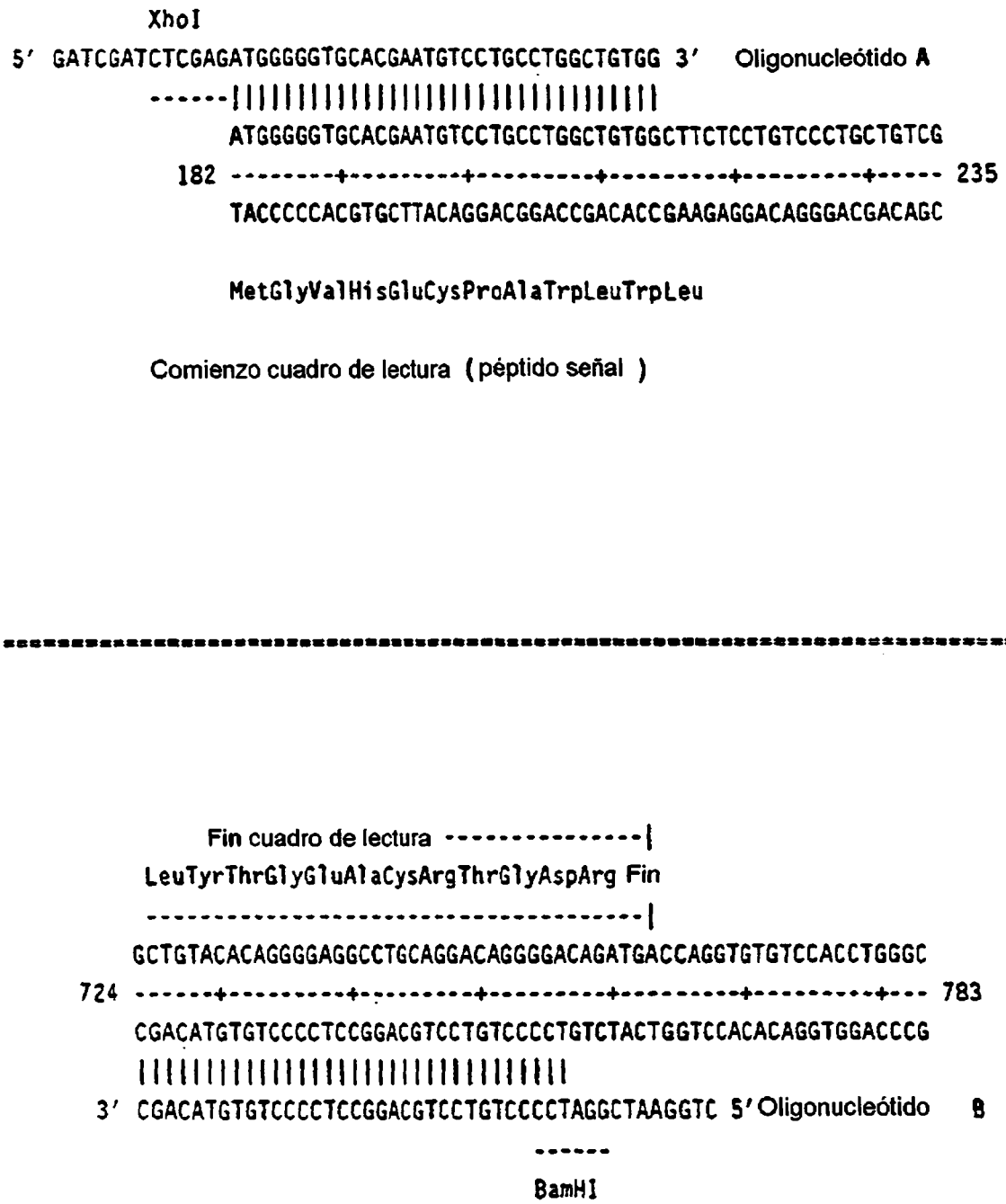

5394
5000
ori
PiVX ori
pBR 322
SV 40
SV 2
empalme + poli (A)
m13
m13 ori
1000
pIL4RFc
5394
SupF
4000
IgG1-Fc
CMV/T7
Promotor
2000
Receptor de IL4extracelular
HindIII (1de 2)
HindIII (2de 2)
XhoI
BamHI (Cuadro: GAT)
3000

Fig. 6

Fig. 1


XhoI
5' GATCGATCTCGAGATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGG 3' Oligonucleótido A
ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTCG
182
235
TACCCCCACGTGCTTACAGGACGGACCGACACCGAAGAGGACAGGGACGACAGC
MetGlyValHisGluCysProAlaTrpLeuTrpLeu
Comienzo cuadro de lectura (péptido señal)
Fin cuadro de lectura
LeuTyrThrGlyGluAlaCysArgThrGlyAspArg Fin
GCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGTGTCCACCTGGGC
724
783
CGACATGTGTCCCCTCCGGACGTCCTGTCCCCTGTCTACTGGTCCACACAGGTGGACCCG
3' CGACATGTGTCCCCTCCGGACGTCCTGTCCCCTAGGCTAAGGTC 5' Oligonucleótido B
BamHI

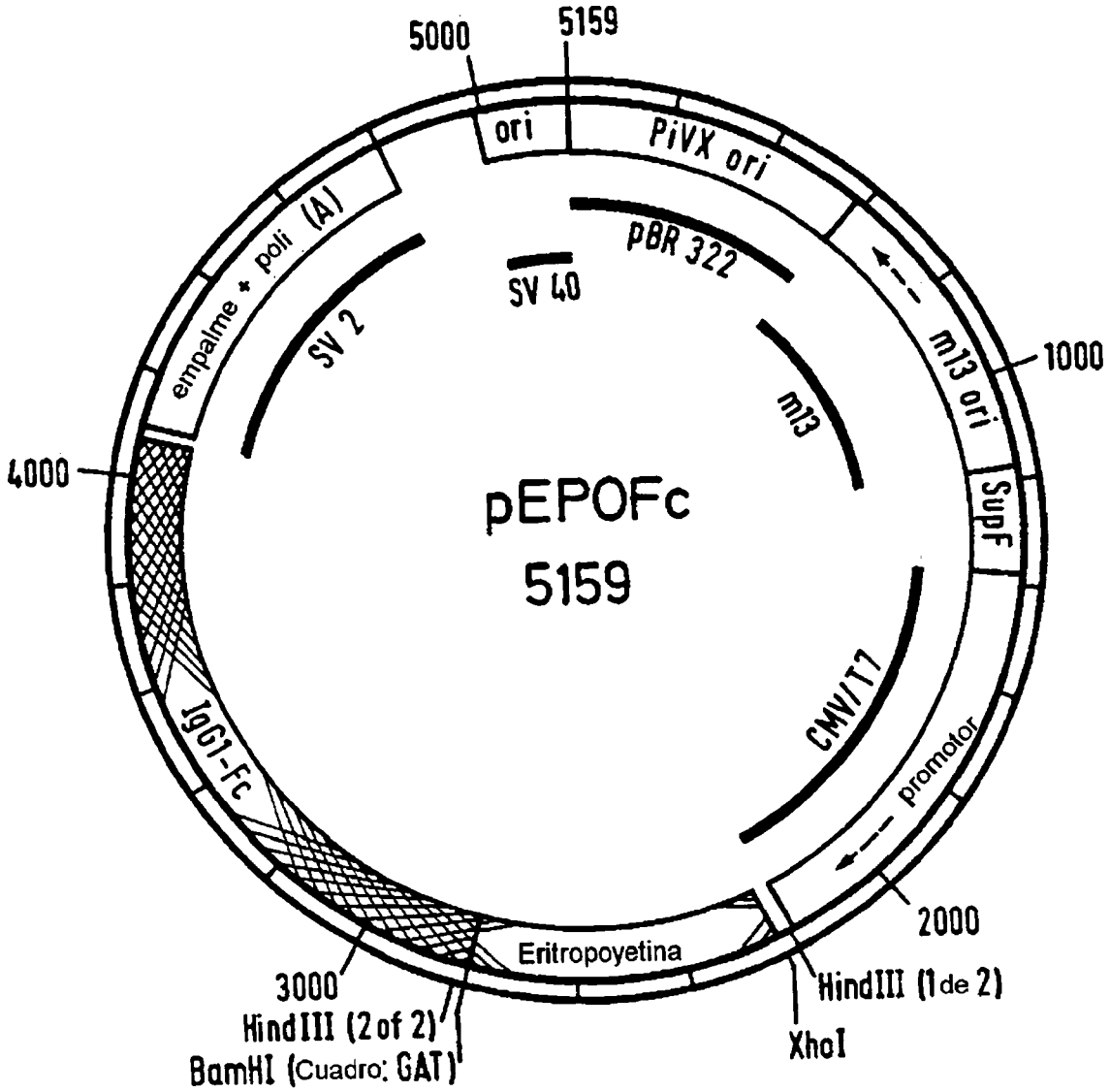

5000
5159
ori
PiVX ori
pBR 322
SV 40
SV 2
empalme + poli (A)
m13
m13 ori
1000
4000
pEPOFc
5159
SupF
CMV/T7
promotor
IgG1-Fc
2000
Eritropoyetina
3000
HindIII (2 of 2)
BamHI (Cuadro: GAT)
HindIII (1 de 2)
XhoI

Fig. 8