

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 120**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016** **PCT/US2016/036915**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016** **WO16201244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016** **E 16808386 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024** **EP 3307304**

54 Título: **Proteínas de fusión de inmunoglobulinas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

12.06.2015 US 201562175186 P
20.01.2016 US 201615002396
09.06.2016 US 201615177605

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
21.10.2024

73 Titular/es:

UBI PHARMA INC. (100.0%)
No. 45, Guangfu N. Rd., Hukou Township
Hsinchu County 30351, TAIWAN, CN

72 Inventor/es:

WANG, CHANG-YI;
PENG, WEN-JIUN y
KAO, WEI-TING

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 120 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 de inmunoglobulinas y usos de las mismas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de fusión terapéutica que comprende un fragmento Fc (por sus siglas en inglés) de una inmunoglobulina G y una molécula bioactiva, en donde el fragmento Fc es de cadena única.

10

Antecedentes de la invención

Una inmunoglobulina comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que se asocian mediante puentes disulfuro entre las cadenas. Cada cadena ligera tiene dos dominios, un dominio ligero variable (V_L, por sus siglas en inglés) y un dominio ligero constante (C_L, por sus siglas en inglés); y cada cadena pesada tiene dos regiones, una región pesada variable (V_H, por sus siglas en inglés) y una región pesada constante (C_H, por sus siglas en inglés). La región pesada constante (C_H) se compone de dominios pesados constantes que se designan por un número (por ejemplo, C_H1, C_H2, C_H3, etc.), (ver, por ejemplo, US 6,086,875 (Blumberg R. S., *et al.*); US 5,624,821 (Winter G. P., *et al.*); y US 5,116,964 (Capon D. J. and Lasky L.A.)). Las inmunoglobulinas se clasifican en diferentes isotipos basados en sus propiedades biológicas, su ubicación en el organismo y su capacidad para enfrentarse a diferentes antígenos (es decir, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, por sus siglas en inglés, respectivamente). Dependiendo del isotipo de la inmunoglobulina, la región pesada constante (C_H) puede tener tres o cuatro dominios C_H. Además, en algunos isotipos (IgA, IgD e IgG), las cadenas pesadas contienen una región bisagra que añade flexibilidad a la molécula (Janeway, *et al.* 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y.).

25

En los seres humanos existen cuatro subclases de IgG (IgG1, 2, 3 y 4), denominadas por orden de abundancia en el suero (IgG1 es la más abundante). El isotipo IgG, se compone de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada contiene tres dominios pesados constantes (C_H1, C_H2, C_H3). Las dos cadenas pesadas de la IgG están enlazadas entre sí y a una cadena ligera por puentes disulfuro (-S-S-). El sitio de unión al antígeno de la IgG se ubica en la región de unión al antígeno del fragmento (región Fab, por sus siglas en inglés), que contiene dominios de cadena ligera variable (V_L) y pesada variable (V_H), así como dominios de cadena ligera constante (C_L) y pesada constante (C_H1). La región cristalizable del fragmento (región Fc) de la IgG es una porción de la cadena pesada que contiene los dominios C_H2 y C_H3 que se unen a un receptor Fc que se encuentra en la superficie de ciertas células, incluido el receptor Fc neonatal (FcRn, por sus siglas en inglés). La cadena pesada de la IgG también tiene una región bisagra (Bisagra) entre los dominios C_H1 y C_H2 que separa la región Fab de la región Fc y participa en el enlace de las dos cadenas pesadas mediante puentes disulfuro. La estructura de la región bisagra contribuye a las propiedades biológicas únicas de cada una de las cuatro subclases de IgG.

30

La IgG se secreta en forma de monómero de pequeño tamaño, lo que le permite perfundir fácilmente los tejidos. Es el único isotipo que tiene receptores (receptor Fc neonatal (FcRn)) que facilitan el paso a través de la placenta humana para proporcionar protección al feto en el útero. Las IgG absorbidas a través de la placenta proporcionan al neonato inmunidad humoral antes de que se desarrolle su propio sistema inmunitario.

40

El sitio de unión del receptor Fc neonatal de la IgG (FcRn) está ubicado en la región Fc del anticuerpo. El FcRn se expresa normalmente en la placenta humana y en las células epiteliales y participa en una ruta endocítica de salvamento que previene la degradación de las IgG. Esta ruta de salvamento está mediada por la afinidad de unión altamente dependiente del pH de la IgG al FcRn en pH ácido. Se cree que la alta afinidad de la IgG por el FcRn a pH ácido resulta en la unión de la IgG internalizada al FcRn después de su recaptura en endosomas ácidos (Goebel NA, *et al.*, 2008; Junghans RP, *et al.*, 1996). Aunque la mayoría de las proteínas solubles se dirigen a los lisosomas después de la internalización, la IgG unida a FcRn internalizada regresa a la membrana plasmática y se rescata efectivamente de la ruta degradativa por defecto. Tras exponerse al pH neutro del espacio extracelular, la IgG se puede disociar posteriormente del FcRn y volver a la circulación. Así, la propiedad de prolongación de la vida media en suero del anticuerpo se mantiene en el fragmento Fc.

45

50

55

Esta ruta de salvamento proporciona un mecanismo para desarrollar fármacos proteicos de nueva generación que tengan una vida media prolongada en la circulación sanguínea en comparación con los fármacos proteicos no modificados. En particular, los fármacos proteicos no modificados tienen una vida media en circulación corta, lo que hace necesarias dosis frecuentes por un periodo de tratamiento prolongado. Se han realizado grandes esfuerzos para prolongar la vida media de los fármacos proteicos por muchos medios, incluidas las tecnologías de proteínas de fusión por PEGilación (U.S. Food and Drug Administration; Osborn BL, *et al.*, 2002); sin embargo, los resultados de estos esfuerzos no han sido los ideales.

60

Se ha descrito la creación de proteínas de fusión que comprenden regiones constantes IgG enlazadas a una proteína de interés, o a un fragmento de la misma. Por ejemplo, la proteína "X" de interés se enlaza a un dominio "Fc" de IgG para crear una proteína de fusión "Fc-X" o "X-Fc" (inmunofusión). Por lo general, las proteínas de

65

inmunofusión se pueden preparar y purificar en mayores cantidades en comparación con otros tipos de proteínas de fusión, ya que la fracción Fc de la proteína de fusión está diseñada para una secreción eficiente por parte de la célula. Se ha demostrado que las proteínas de fusión que contienen una región Fc de una inmunoglobulina presentan características mejoradas en comparación con sus homólogas que no contienen Fc, como una mayor estabilidad de la proteína y una vida media en suero más prolongada (ver Capon, *et al.*, 1989, *Nature* 337:525), así como la capacidad de unirse a receptores Fc tales como el receptor Fc neonatal (FcRn) (ver, por ejemplo, US 6,086,875 (Blumberg R. S., *et al.*); US 6,485,726 (Blumberg R. S., *et al.*); US 6,030,613; WO 03/077834 (Blumberg R. S., *et al.*); y US 2003-0235536A1 (Blumberg R. S., *et al.*)). Los siguientes documentos de patentes describen ejemplos adicionales.

US 5,116,964 (Capon D. J. and Lasky L. A.) divulga una proteína de pareja de unión a ligando que comprende una glicoproteína de superficie celular de linfocitos (LHR, por sus siglas en inglés) y una cadena de inmunoglobulina, en la que la proteína de pareja de unión a ligando y la inmunoglobulina están fusionadas a través de un grupo amino N-terminal o carboxilo C-terminal.

WO 94/04689 (Pastan I. H., *et al.*) divulga el uso de Fc de inmunoglobulina para proporcionar una toxina de vida media prolongada que incluye un dominio de unión al ligando (receptor CD4) y una exotoxina A de *Pseudomonas*.

US 6,797,493 (Sun L-H., *et al.*) divulga una proteína de fusión hGCSF-L-vFc, que comprende el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (hGCSF, por sus siglas en inglés), un enlazador peptídico flexible (L, por su sigla en inglés) de aproximadamente 20 aminoácidos o menos, y una variante Fc de IgG humana. La variante Fc es de naturaleza no lítica y muestra mínimos efectos secundarios indeseables mediados por Fc.

US 8,557,232 (Gillies S. D., *et al.*) divulga un método y una composición para expresar proteínas de fusión Fc-IFN β (por sus siglas en inglés) solubles y biológicamente activas y variantes de las mismas (Fc-IFN β^{sol}). La proteína de fusión Fc-IFN β incluye una proteína IFN β unida al carboxilo terminal de la región Fc de la inmunoglobulina

Los documentos anteriores describen proteínas de fusión con un diseño de proteína de fusión Fc de dos cadenas con dos moléculas bioactivas muy próximas entre sí. Las moléculas bioactivas de estas proteínas de fusión tradicionales generalmente están suprimidas o impedidas estéricamente para interactuar con las moléculas o células objetivo. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una proteína de fusión que comprenda una molécula bioactiva enlazada a una región Fc modificada de una IgG, que pueda conferir un aumento de la vida media *in vivo* de las moléculas bioactivas sin suprimir la bioactividad de la molécula bioactiva. Tales proteínas de fusión modificadas aportarían una ventaja añadida para facilitar la purificación por procesos de purificación por afinidad relacionados.

Referencias:

1. Blumberg R. S., *et al.*, "Receptor specific transepithelial transport of therapeutics" Patentes de EE.UU. Nos. 6,030,613 (2000), 6,086,875 (2000), y 6,485,726 (2002).

2. Blumberg R. S., *et al.*, "Central airway administration for systemic delivery of therapeutics" WO 03/077834 (2002) y Solicitud de Patente de EE.UU. 2003-0235536A1 (2003).

3. Capon D. J., *et al.*, "Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy" *Nature* 337: 525 (1989).

4. Capon D. J. and Lasky L. A., "Hybrid immunoglobulins" Patente de EE.UU. 5,116,964 (1992).

5. Gillies S. D., *et al.*, "Stabilization of Fc-interferon-beta fusion proteins", Patente de EE.UU. 8,557,232 (2013).

6. Goebel N.A., *et al.*, "Neonatal Fc Receptor Mediates Internalization of Fc in Transfected Human Endothelial Cells" *Mol. Biol. Cell*, 19(12): 5490-5505 (2008).

7. Janeway, *et al.*, Immunobiology, *Garland Publishing*, N.Y., N.Y (2001).

8. Junghans R.P., *et al.*, "The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor" *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(11): 5512-5516 (1996).

9. Ober R. J., *et al.*, "Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level" *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(30): 11076-81 (2004).

10. Ober R. J., *et al.*, "Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn" *J Immunol*. 172(4): 2021-9 (2004).

11. Osborn B. L., *et al.*, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys" *J Pharmacol Exp Ther*. 303(2): 540-8 (2002).

12. Pastan I.H., *et al.*, "Recombinant toxin with increased half-life" WO 94/04689 (1993).

13. Peters R. T., *et al.*, "Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein" *Blood*. 115(10): 2057-64 (2010).

14. Sun L-H., *et al.*, "Fc fusion proteins of human granulocyte colony-stimulating factor with increased biological activities" Patente de EE.UU. 6,797,493 (2004).

15. Winter G P., *et al.*, "Antibodies with altered effector functions" Patente de EE.UU. 5,624,821 (1997).

16. Vaccaro C., *et al.*, "Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate *in vivo* antibody levels" *Nat Biotechnol*. 23(10): 1283-8 (2005).

Breve descripción de la invención

La presente divulgación está dirigida a nuevas proteínas de fusión que comprenden una porción de una molécula de inmunoglobulina (Ig), composiciones de las mismas y métodos para fabricar las proteínas de fusión divulgadas. Las proteínas de fusión divulgadas son útiles para prolongar la vida media en suero de moléculas bioactivas en un organismo.

Un aspecto de la presente divulgación se relaciona con una proteína de fusión producida en una célula de mamífero, y a composiciones de la misma. La proteína de fusión de la presente divulgación comprende generalmente (a) una molécula bioactiva seleccionada del grupo que consiste en eritropoyetina, Factor IX, IFN α , GCSF e IFN β , y (b) un fragmento Fc de cadena única (sFc, por sus siglas en inglés) de una molécula IgG que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61, 62, 63 y 64, y (c) una región bisagra entre la molécula bioactiva y el fragmento sFc, en donde la región bisagra está mutada y no forma puentes disulfuro con otra proteína de fusión u otra molécula de inmunoglobulina, y en donde la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23-60. La secuencia de aminoácidos de (a) la molécula bioactiva y (b) el fragmento Ig de la proteína de fusión se derivan de la secuencia de tipo silvestre de cada fragmento, como se divulga en la técnica. Las secuencias derivadas incluyen la secuencia de tipo silvestre, así como homólogos, análogos, fragmentos y otras variantes de la secuencia de tipo silvestre.

El fragmento Ig de la proteína de fusión comprende un Fc de cadena única (sFc o scFc), un monómero, que es incapaz de formar un dímero unido por un puente disulfuro. La proteína de fusión incluye además una secuencia correspondiente a una región bisagra de inmunoglobulina. La región bisagra contiene una modificación que previene que la proteína de fusión forme un puente disulfuro con otra proteína de fusión o con otra molécula de inmunoglobulina. La región bisagra se modifica al mutar y/o eliminar uno o más aminoácidos de cisteína para prevenir la formación de un puente disulfuro. La molécula bioactiva está enlazada al scFc a través de una región bisagra. En realizaciones específicas, la proteína de fusión comprende la molécula bioactiva en su N-terminal que está enlazada a una scFc a través de una región bisagra mutada. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden la proteína de fusión y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con métodos para fabricar una proteína de fusión y composiciones de la misma. El método para fabricar la proteína de fusión se lleva a cabo en una célula de mamífero y comprende (i) proporcionar una molécula bioactiva y un fragmento sFc que comprende una región bisagra, en donde la molécula bioactiva seleccionada del grupo que consiste en eritropoyetina, Factor IX, IFN α , GCSF e IFN β , (ii) mutar la región bisagra del fragmento sFc por sustitución y/o supresión de aminoácidos para formar una región bisagra mutada de un fragmento sFc mutado, y (iii) unir la molécula bioactiva al fragmento Fc a través de la región bisagra mutada para formar la proteína de fusión, o la composición de la misma, en donde la región bisagra mutada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23-60, y en donde la región bisagra mutada no forma puentes disulfuro con otra proteína de fusión u otra molécula de inmunoglobulina.

La descripción detallada de la invención se da en las siguientes realizaciones con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A a 1D** ilustran el diseño de una proteína de fusión de cadena única de acuerdo con varias realizaciones de la presente divulgación. La **Figura 1A** ilustra una proteína de fusión que comprende una molécula biológicamente activa en el N-terminal que está enlazada covalentemente a una región bisagra y a un fragmento Fc (dominios C H_2 y C H_3) de IgG humana. La **Figura 1B** ilustra una proteína de fusión que comprende una molécula biológicamente activa en el N-terminal que está enlazada covalentemente a una región bisagra y a un fragmento Fc (dominios C H_2 y C H_3) de IgG humana a través de un enlazador. La **Figura 1C** ilustra una proteína de fusión que

comprende una molécula biológicamente activa en el C-terminal que está enlazada covalentemente a una región bisagra y a un fragmento Fc (dominios C_H2 y C_H3) de IgG humana. La **Figura 1D** ilustra una proteína de fusión que comprende una molécula biológicamente activa en el C-terminal que está enlazada covalentemente a una región bisagra y a un fragmento Fc (dominios C_H2 y C_H3) de IgG humana a través de un enlazador.

La **Figura 2** ilustra un mapa del plásmido pZD/EPO-sFc (por sus siglas en inglés). El plásmido pZD/EPO-sFc codifica una proteína de fusión EPO-sFc de acuerdo con una realización de la presente invención.

La **Figura 3** ilustra un mapa del plásmido pZD/FIX-sFc (por sus siglas en inglés). El plásmido pZD/FIX-sFc codifica una proteína de fusión Factor IX-sFc de acuerdo con una realización de la presente invención.

La **Figura 4** ilustra un perfil de SDS-PAGE (por sus siglas en inglés, respectivamente), por una tinción con azul de Coomassie, de la proteína de fusión Fc de cadena única de eritropoyetina (EPO-sFc) producida por los métodos divulgados en la presente. El carril M es un marcador de peso molecular (MW, por sus siglas en inglés; el marcador contiene proteínas recombinantes de tamaño 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa). El carril 1 es una proteína de fusión EPO-sFc en el medio de cultivo celular. El carril 2 es un eluido de la proteína de fusión EPO-sFc purificada por la resina de proteína A (columna MabSelect SuRe™ Hitrap). El carril 3 es un eluido de la proteína de fusión EPO-sFc purificada por la columna DEAE (por sus siglas en inglés). El MW de EPO-sFc (carriles 1 a 3) está entre 50-70 kDa con un alto contenido de glicosilación.

La **Figura 5** ilustra un perfil de SDS-PAGE, por una tinción con azul de Coomassie, de la proteína de fusión Fc de cadena única del Factor IX (Factor IX-sFc) producida por los métodos divulgados en la presente. El carril M es un marcador de peso molecular (el marcador contiene proteína recombinante de tamaño 50, 75, 100 y 150 kDa). El carril 1 es un Factor IX humano recombinante original (BeneFIX®). El carril 2 es un eluido de la proteína de fusión Factor IX-sFc purificada por la resina de proteína A (columna MabSelect SuRe™ Hitrap). El MW de Factor IX-sFc (carril 2) está entre 100-110 kDa con alto contenido de glicosilación.

La **Figura 6** es una gráfica que muestra el perfil farmacocinético (PK, por sus siglas en inglés) de una administración subcutánea (S.C., por sus siglas en inglés) de una dosis única de proteína de fusión Fc de cadena única de eritropoyetina (EPO-sFc) (círculos cerrados) y EPO humana recombinante original (EPREX®) (círculos abiertos) en ratas. Para la administración de una dosis única S.C. de EPO-sFc a 16,8 µg/kg, la vida media de EPO-sFc es de aproximadamente 22 horas, 3 veces mayor que la de EPREX®.

La **Figura 7** es una gráfica que muestra el perfil farmacocinético (PK) de una administración intravenosa (I.V., por sus siglas en inglés) de una dosis única de la proteína de fusión Fc de cadena única del Factor IX (FIX-sFc) (cuadrados) y del Factor IX humano recombinante original (BeneFIX®) (triángulos) en ratas. La vida media de FIX-sFc es de aproximadamente 56 horas para administración intravenosa, 5 veces más que BeneFIX® (T_{1/2} = 11,91 horas).

La **Figura 8** ilustra un mapa de plásmidos de pZD/IFNα-sFc. El plásmido pZD/IFNα-sFc codifica una proteína de fusión IFNα-sFc de acuerdo con una realización de la presente invención.

La **Figura 9** ilustra un perfil de SDS-PAGE, por una tinción con azul de Coomassie, de la proteína de fusión Fc de cadena única de interferón alfa (IFNα-sFc) producida por los métodos divulgados en la presente. El carril M es un marcador de peso molecular (el marcador contiene proteínas recombinantes de tamaño 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa). Los carriles 1 y 2 son eluidos de la proteína de fusión IFNα-sFc que contienen de 0,2 a 0,4 M de sacarosa, respectivamente. Los carriles 3 y 4 son eluidos de la proteína de fusión IFNα-sFc que contienen de 1,0 a 2,0 M de urea, respectivamente.

La **Figura 10** es una gráfica que muestra el perfil farmacocinético (PK) de una administración subcutánea (C.S.) de una dosis única de Pegasys® (círculos), proteína de fusión Fc de cadena única de interferón alfa (IFNα-sFc) (rectángulos), Peg-Intron® (triángulos regulares), y Roferon-A® (triángulos invertidos) en ratas. La vida media de IFNα-sFc es de aproximadamente 50,2 horas, más larga que la de otros productos de interferón.

La **Figura 11** es una gráfica que muestra la actividad antiviral de la proteína de fusión Fc de cadena única de interferón alfa (IFNα-sFc) (círculos), Pegasys® (triángulos regulares), y la proteína de fusión Fc de interferón alfa (IFNα-Fc) (triángulos invertidos) en ratas. La actividad antiviral (IC₅₀, por sus siglas en inglés) de IFNα-sFc es de aproximadamente 0,0061 nM, mucho mejor que la de IFNα-Fc (IC₅₀ = 0,0313 nM) y Pegasys® (IC₅₀ = 0,0894).

Las **Figuras 12A a 12B** ilustran los perfiles de asociación de IFNα-sFc con el receptor 1 del interferón-alfa (IFNAR1, por sus siglas en inglés) (**Figura 12A**), y de IFNα-Fc con el IFNAR1 (**Figura 12B**).

La **Figura 13** ilustra un mapa de plásmidos de pZD/GCSF-sFc. El plásmido pZD/GCSF-sFc codifica una proteína de fusión IFNα8-sFc de acuerdo con una realización de la presente invención.

La **Figura 14** ilustra un perfil de SDS-PAGE, por una tinción con azul de Coomassie, de la proteína de fusión Fc

de cadena única de GCSF (GCSF-sFc) producida por los métodos divulgados en la presente. El carril M es un marcador de peso molecular (el marcador contiene proteínas recombinantes de tamaño 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa). El carril 1 es un eluido de GCSF-sFc.

5 La **Figura 15** es una gráfica que muestra el perfil farmacocinético (PK) de una administración subcutánea (C.S.) de una dosis única de proteína de fusión Fc de cadena única de GCSF (GCSF-sFc) (círculos), Lenograstim (Granocyte®) (triángulos) y Peg-filgrastim (Neulasta®) (rectángulos) en ratas. La vida media de GCSF-sFc es de aproximadamente 17,16 horas, más larga que la del Lenograstim (4,1 horas) y del Peg-filgrastim (12,0 horas).

10 La **Figura 16** es una gráfica que muestra la actividad biológica de la administración subcutánea (C.S.) de una dosis única (grupos B1 y B2) o cuatro dosis (grupo B3) de Lenograstim y una administración subcutánea (C.S.) de una dosis única de la proteína de fusión Fc de cadena única del GCSF (GCSF-sFc) (grupos C1 y C2). La GCSF-sFc tiene una mayor actividad para potenciar la diferenciación y proliferación de neutrófilos en ratones que el Lenograstim.

15 La **Figura 17** es un mapa de plásmidos de pZD-IFN β -sFc. El plásmido pZD-IFN β -sFc codifica una proteína de fusión IFN β -sFc de acuerdo con una realización de la presente invención.

20 La **Figura 18** es una gráfica que muestra el perfil farmacocinético (PK) de una administración subcutánea (C.S.) de una dosis única de la proteína de fusión Fc de cadena única del interferón β (IFN β -sFc) (rectángulos) y Rebif® (rombos) en ratas. La vida media de IFN β -sFc es de aproximadamente 31,89-37,7 horas, más larga que la de Rebif® (18,92-23,57 horas).

25 La **Figura 19** es una gráfica que muestra la inhibición de la osteopontina (OPN, por sus siglas en inglés) por la proteína de fusión IFN β -sFc y Rebif®. La proteína de fusión IFN β -sFc mostró un efecto inhibitor significativo de $73,4 \pm 0,8 \%$ y de $79,5 \pm 3,6 \%$, tanto a 1,5 ng/mL como a 10 ng/mL, respectivamente. La actividad biológica de IFN β -sFc fue comparable a la de Rebif®.

Descripción detallada de la invención

30 La presente divulgación está dirigida a nuevas proteínas de fusión que comprenden una molécula bioactiva y porciones de una molécula de inmunoglobulina. Varios aspectos de la presente divulgación se refieren a proteínas de fusión, composiciones de las mismas y métodos para fabricar y usar las proteínas de fusión divulgadas. Las proteínas de fusión divulgadas son útiles para prolongar la vida media en suero de moléculas bioactivas en un organismo.

35 A continuación se proporciona una descripción detallada para ayudar a los expertos en la técnica a poner en práctica la presente invención. La terminología usada en la descripción sirve únicamente para describir realizaciones particulares y no está contemplada como limitante de la invención. Los títulos de las secciones que se indican a continuación se usan únicamente con efectos organizativos y no se deben interpretar como una limitación de la materia descrita.

1. Proteína de fusión

45 Como se usa en la presente, una "proteína de fusión" o un "polipéptido de fusión" es una proteína o polipéptido híbrido que comprende al menos dos proteínas o péptidos enlazados de una manera que normalmente no se encuentra en la naturaleza.

50 Un aspecto de la presente divulgación se dirige a una proteína de fusión que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina (Ig) y una molécula bioactiva como se ha definido anteriormente. La molécula bioactiva que se incorpora a la proteína de fusión divulgada tiene propiedades biológicas mejoradas en comparación con la misma molécula bioactiva no fusionada o incorporada a una proteína de fusión descrita en la técnica anterior (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen una región Fc de dos cadenas). Por ejemplo, la molécula bioactiva incorporada a la proteína de fusión divulgada tiene una vida media en suero más larga en comparación con su homóloga no fusionada. Además, la proteína de fusión divulgada mantiene la actividad biológica completa de la molécula bioactiva sin ninguna disminución funcional, lo que supone una mejora con respecto a las proteínas de fusión de las técnicas anteriores que presentan una disminución de la actividad debido al impedimento estérico de una región Fc de dos cadenas.

60 Las proteínas de fusión de la presente divulgación proporcionan ventajas biológicas significativas a las moléculas bioactivas en comparación con las moléculas bioactivas no fusionadas y las moléculas bioactivas incorporadas a proteínas de fusión descritas en la técnica previa.

65 La proteína de fusión divulgada puede tener cualquiera de las siguientes fórmulas (también mostradas en las **Figuras 1A a 1D**):

(B)-(Bisagra)-(C _{H2} -C _{H3})	(Fórmula 1)	(Figura 1A)
(C _{H3} -C _{H2})-(Bisagra)-(B)	(Fórmula 2)	(Figura 1B)
(B)-(L) _m -(Bisagra)-(C _{H2} -C _{H3}); o	(Fórmula 3)	(Figura 1C)
(C _{H3} -C _{H2})-(Bisagra)-(L) _m -(B)	(Fórmula 4)	(Figura 1D)

en donde

"B" es una molécula bioactiva;

5 "Bisagra" es una región bisagra de una molécula IgG;

"C_{H2}-C_{H3}" son los dominios de región constante C_{H2} y C_{H3} de una cadena pesada IgG;

"L" es un enlazador opcional; y

"m" puede ser un número entero cualquiera o 0.

10 Las distintas porciones/fragmentos de la proteína de fusión se tratan más adelante.

a. Región Fc y Fragmento Fc

15 La proteína de fusión de la presente divulgación contiene un fragmento Fc de una molécula de inmunoglobulina (Ig), seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61, 62, 63, y 64.

20 Como se usa a continuación, "región Fc" se refiere a una porción de una inmunoglobulina ubicada en el extremo C-terminal de la región constante de la cadena pesada. La región Fc es la parte de la inmunoglobulina que interactúa con un receptor de la superficie celular (un receptor Fc) y otras proteínas del sistema del complemento para ayudar a activar el sistema inmunitario. En los isotipos IgG, IgA e IgD, la región Fc contiene dos dominios de cadena pesada (dominios C_{H2} y C_{H3}). En los isotipos IgM e IgE, la región Fc contiene tres dominios constantes de cadena pesada (dominios C_{H2} a C_{H4}). Aunque los límites de la porción Fc pueden variar, la porción Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente para comprender los residuos C226 o P230 hasta su carboxilo terminal, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU (por sus siglas en inglés).

25 En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende un dominio C_{H2}-C_{H3}, que es un fragmento de unión a FcRn, que se puede reciclar de nuevo a la circulación. Las proteínas de fusión que tienen este dominio demuestran un aumento de la vida media *in vivo* de las proteínas de fusión.

30 Como se usa en la presente, un "fragmento Fc" se refiere a la porción de la proteína de fusión que corresponde a una región Fc de una molécula de inmunoglobulina de cualquier isotipo. El fragmento Fc comprende la región Fc de IgG. El fragmento Fc es un fragmento Fc de cadena única (sFc) de una molécula IgG que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61, 62, 63, y 64.

35 El fragmento Fc se puede obtener o producir por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el fragmento Fc se puede aislar y purificar a partir de un animal, expresar recombinantemente o producir sintéticamente. En algunas realizaciones, el fragmento Fc está codificado en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) y aislado de una célula, línea germinal, biblioteca de ADNc o biblioteca de fagos.

40 La región Fc y/o el fragmento Fc incluyen una región bisagra que se encuentra en algunos isotipos de inmunoglobulina (IgA, IgD e IgG). El fragmento Fc se modifica al mutar la región bisagra para que no contenga ninguna Cys y no pueda formar puentes disulfuro. La región de bisagra se analiza más adelante.

45 El fragmento Fc de la proteína de fusión divulgada es un Fc de cadena única. Como se usa en la presente, "Fc de cadena única" (de "sFc") significa que el fragmento Fc está modificado de modo tal que previene que forme un dímero enlazado por disulfuro (por ejemplo, por modificación química o mutación, delección o sustitución de un aminoácido).

50 El fragmento Fc de la proteína de fusión se deriva de la IgG1 humana, que puede incluir la secuencia de aminoácidos de la IgG1 humana de tipo silvestre o variaciones de la misma. En algunas realizaciones, el fragmento Fc de la proteína de fusión contiene un aminoácido Asn que sirve como sitio de N-glicosilación en la posición de aminoácido 297 de la molécula IgG1 humana nativa (basada en el sistema de numeración europeo para IgG1, como se discute en la Patente de EE.UU. No. 7,501,494), que corresponde al residuo 67 en el fragmento Fc (SEQ ID NO: 61). En otras realizaciones, el sitio de N-glicosilación en el fragmento Fc se elimina al mutar el residuo Asn (N) por His (H) (SEQ ID NO: 62) o Ala (A) (SEQ ID NO: 63). Un fragmento Fc que contiene una posición variable en el sitio de N-glicosilación se muestra como la SEQ ID NO: 64 en el Listado de Secuencias.

60 En algunas realizaciones, el dominio C_{H3}-C_{H2} del fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de tipo silvestre (descrita en la SEQ ID NO: 61). En ciertas realizaciones, el dominio C_{H3}-C_{H2} del fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, donde el sitio de N-glicosilación se elimina al mutar el residuo Asn (N) por His (H). En ciertas realizaciones, el dominio C_{H3}-C_{H2} del fragmento Fc tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, donde el sitio de N-glicosilación se elimina al mutar el

residuo Asn (N) por Ala (A).

b. Región bisagra

5 La proteína de fusión divulgada incluye una región bisagra que se encuentra en algunos isotipos de inmunoglobulina (IgA, IgD e IgG). La región bisagra separa la región Fc de la región Fab, añade flexibilidad a la molécula y puede enlazar dos cadenas pesadas mediante puentes disulfuro. La formación de un dímero, compuesto por dos dominios C_H2-C_H3, es necesaria para las funciones que proporcionan las regiones Fc intactas. Los puentes disulfuro entre las cisteínas de la región bisagra del tipo silvestre ayudan a mantener unidas las dos cadenas de las moléculas Fc para crear una unidad funcional.

La región bisagra se deriva de la IgG, concretamente de la IgG1. La región bisagra puede ser una región bisagra de longitud completa o una región bisagra modificada (truncada).

15 La región bisagra contiene una modificación que previene que la proteína de fusión forme un puente disulfuro con otra proteína de fusión o con una molécula de inmunoglobulina. La región bisagra se modifica al mutar y/o eliminar uno o más aminoácidos de cisteína para prevenir la formación de un puente disulfuro. El N-terminal o el C-terminal de la región bisagra de longitud completa se pueden deletar para formar una región bisagra truncada. Para evitar la formación de puentes disulfuro, la cisteína (Cys) de la región bisagra se puede sustituir por un aminoácido que no sea Cys o se puede deletar. En realizaciones específicas, la Cys de la región bisagra se puede sustituir por Ser, Gly, Ala, Thr, Leu, Ile, Met o Val. Los ejemplos comparativos de regiones bisagra de tipo silvestre y mutadas de IgG1 a IgG4 incluyen las secuencias de aminoácidos mostradas en la **Tabla 1** (SEQ ID NO: 1 a 22). No se pueden formar puentes disulfuro entre dos regiones bisagra que contengan secuencias mutadas de la invención. La región bisagra de la IgG1 de la invención se modificó para acomodar varias regiones bisagra mutadas con secuencias que se muestran en la **Tabla 2** (SEQ ID NO: 23-60).

c. Enlazador

30 La proteína de fusión puede tener la molécula bioactiva enlazada al N-terminal del fragmento Fc. Alternativamente, la proteína de fusión puede tener la molécula bioactiva unida al C-terminal del fragmento Fc. El enlace es una unión covalente, y preferiblemente una unión peptídica.

En la presente invención, una o más moléculas bioactivas pueden estar directamente enlazadas al C-terminal o al N-terminal del fragmento Fc. Preferiblemente, la molécula o moléculas bioactivas pueden estar directamente enlazadas a la bisagra del fragmento Fc.

Adicionalmente, la proteína de fusión puede comprender opcionalmente al menos un enlazador. Así, la molécula bioactiva puede no estar enlazada directamente al fragmento Fc. El enlazador puede intervenir entre la molécula bioactiva y el fragmento Fc. El enlazador se puede enlazar al N-terminal del fragmento Fc o al C-terminal del fragmento Fc.

En una realización, el enlazador incluye aminoácidos. El enlazador puede incluir 1-5 aminoácidos.

d. Molécula bioactiva

45 Como se usa en la presente, el término "molécula biológicamente activa" se refiere a proteínas, glicoproteínas y combinaciones de las mismas. La molécula bioactiva se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina, Factor IX, IFN α , GCSF e IFN β .

50 En una realización, la molécula biológicamente activa es la eritropoyetina (EPO, por sus siglas en inglés). La eritropoyetina, una glicoproteína ácida de aproximadamente 34.000 daltones de peso molecular, es una hormona glicoproteica que interviene en la maduración de las células progenitoras eritroides en eritrocitos. Es esencial para regular los niveles de eritrocitos en circulación. La eritropoyetina natural es producida por el hígado durante la vida fetal y por el riñón de los adultos, circula por la sangre y estimula la producción de glóbulos rojos en la médula ósea. Ver, Eritropoyetina, solución concentrada de la Farmacopea Europea. En una realización específica, la proteína EPO tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: **65**.

60 En otra realización, la molécula biológicamente activa es el Factor IX (FIX, por sus siglas en inglés). El FIX, una proteína globular con un peso molecular de aproximadamente 70.000 daltones, es una proteína dependiente de la vitamina K que participa en la coagulación sanguínea. Se sintetiza en forma de zimógeno y experimenta tres tipos de modificaciones postraduccionales antes de ser secretada a la sangre. En los humanos, el hígado es el lugar de síntesis del FIX. Esta proteína participa en el ciclo de coagulación de la sangre y se usa para el tratamiento de pacientes con hemofilia B. En la actualidad, la única fuente de FIX disponible comercialmente es el plasma humano. Ver, Factor IX de la coagulación humana de la Farmacopea Europea. En una realización específica, la proteína FIX tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: **67**.

En otras realizaciones, la molécula biológicamente activa es interferón alfa (IFN α) o interferón beta (IFN β). Los interferones (IFN) son glicoproteínas (19-20 kDa) que poseen efectos antivirales, inmunomoduladores y antiproliferativos y se dividen en tres clases (tipos I, II y III) en función de su homología estructural y del receptor específico al que se asocian. La familia del IFN de tipo I incluye numerosas variantes del IFN alfa, un único miembro del IFN beta y los menos conocidos IFN épsilon, kappa, omega y delta. Sin embargo, todos los IFN de tipo I se unen exclusivamente al receptor IFN alfa (IFNAR). Los IFN alfa son producidos por los leucocitos en respuesta a diferentes estímulos, mientras que los IFN beta son producidos por la mayoría de los tipos celulares, excepto los leucocitos. El IFN beta tiene una homología de aminoácidos de 30 % con el IFN alfa, pero con una mayor afinidad de unión al IFNAR en comparación con el IFN alfa. Los IFN alfa y beta se usan en el tratamiento de varios cánceres humanos y enfermedades de origen viral. En una realización específica, la proteína IFN α es IFN α 8 con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69. En una realización específica, la proteína IFN β tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73.

En otra realización, la molécula biológicamente activa es el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF). El factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) es una glicoproteína de 20 kDa con una cadena polipeptídica única de 174 o 177 aminoácidos. La forma más corta posee mayor actividad y estabilidad que la isoforma más larga y es la base de los productos farmacéuticos comerciales de GCSF. El GCSF estimula la proliferación de células progenitoras neutropénicas y su diferenciación en granulocitos, y también activa los neutrófilos maduros. El GCSF se usa con mayor frecuencia en el tratamiento de la neutropenia inducida por la quimioterapia. En una realización específica, la proteína GCSF tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71.

2. Composiciones

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden la proteína de fusión y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar al mezclar la proteína de fusión con portadores opcionales farmacéuticamente aceptables. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y similares. Los ejemplos de portadores incluyen agua, soluciones salinas u otros amortiguadores (tales como amortiguadores de fosfato o de citrato), aceite, alcohol, proteínas (como albúmina de suero, gelatina), carbohidratos (tales como monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos como glucosa, sacarosa, trehalosa, manosa, manitol, sorbitol o dextrinas), gel, lípidos, liposomas, estabilizadores, conservantes, antioxidantes como ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes, tal como EDTA (por sus siglas en inglés); contraiones formadores de sales como el sodio; tensioactivos no iónicos como TWEEN[™], PLURONICS[™] o polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés), o combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener más de un compuesto activo. Por ejemplo, la formulación puede contener una o más proteínas de fusión y/o uno o más compuestos beneficiosos adicionales. Los principios activos se pueden combinar con el portador de cualquier manera conveniente y práctica, por ejemplo, por mezcla, solución, suspensión, emulsificación, encapsulación, absorción y similares, y se pueden realizar en formulaciones tal como polvo (incluyendo polvo liofilizado), suspensiones que son adecuadas para inyecciones, infusión, o similares. También se pueden preparar preparados de liberación sostenida.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen la proteína de fusión para uso humano. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en un amortiguador apropiado que incluya, por ejemplo, citrato, fosfato, Tris, BIS-Tris, etc. a un pH apropiado y también pueden contener excipientes tales como azúcares (50 mM a 500 mM de sacarosa, trehalosa, manitol, o mezclas de los mismos), tensioactivos (por ejemplo, 0,025 % - 0,5 % de Tween 20 o Tween 80), y/u otros reactivos. La formulación se puede preparar para contener varias cantidades de proteína de fusión. En general, las formulaciones para la administración a un sujeto contienen entre aproximadamente 0,1 mg/mL y aproximadamente 200 mg/mL. En ciertas realizaciones, las formulaciones pueden contener entre aproximadamente 0,5 mg/mL y aproximadamente 50 mg/mL; entre aproximadamente 1,0 mg/mL y aproximadamente 50 mg/mL; entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 25 mg/mL; o entre aproximadamente 10 mg/mL y aproximadamente 25 mg/mL de proteína de fusión. En realizaciones específicas, las formulaciones contienen aproximadamente 1,0 mg/mL, aproximadamente 5,0 mg/mL, aproximadamente 10,0 mg/mL o aproximadamente 25,0 mg/mL de proteína de fusión.

3. Métodos

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con métodos para fabricar una proteína de fusión y composiciones de la misma.

a. Producción de la proteína de fusión

El método para fabricar la proteína de fusión comprende (i) proporcionar una molécula bioactiva y un fragmento sFc que comprende una región bisagra, (ii) modificar la región bisagra para prevenir que forme un puente disulfuro,

y (iii) unir la molécula bioactiva directa o indirectamente al scFc a través de la región bisagra mutada para formar la proteína de fusión, el híbrido, el conjugado o la composición de los mismos. La presente divulgación también describe un método para purificar la proteína de fusión, que comprende (i) proporcionar una proteína de fusión, y (ii) purificar la proteína de fusión por medios de cromatografía basados en Proteína A o Proteína G.

La proteína de fusión se puede expresar alternativamente por técnicas de biología molecular bien conocidas. Cualquier manual estándar sobre tecnología de clonación molecular proporciona protocolos detallados para producir la proteína de fusión de la invención por la expresión de ADN y ARN recombinantes. Para construir un gen que exprese una proteína de fusión de esta invención, la secuencia de aminoácidos se traduce inversamente en una secuencia de ácido nucleico, preferiblemente usando codones optimizados para el organismo en el que se expresará el gen. A continuación, se fabrica un gen que codifica el péptido o la proteína, típicamente al sintetizar oligonucleótidos superpuestos que codifican la proteína de fusión y los elementos reguladores necesarios. El gen sintético se ensambla y se inserta en el vector de expresión deseado. Las secuencias sintéticas de ácido nucleico que abarca esta invención incluyen las que codifican la proteína de fusión de la invención, y constructos de ácido nucleico caracterizados por cambios en las secuencias no codificantes que no alteran la actividad biológica de la molécula codificada por lo mismo. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se obtienen y caracterizan recombinantes. La proteína de fusión se expresa en condiciones apropiadas para el sistema de expresión y el huésped seleccionados. La proteína de fusión se purifica por una columna de afinidad de proteína A o proteína G (por ejemplo, SoftMax®, AcroSep®, Sera-Mag® o Sepharose®).

La proteína de fusión de la presente invención se puede producir en células de mamífero. Los ejemplos de células de mamífero son las células COS (por sus siglas en inglés) de mono, las células CHO (por sus siglas en inglés), las células 293 de riñón humano, las células A431 epidérmicas humanas, las células Colo205 humanas, las células 3T3, las células CV-1 (por sus siglas en inglés), otras líneas celulares transformadas de primate, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HeLa (por sus siglas en inglés), células L de ratón, células BHK (por sus siglas en inglés), HL-60, U937, HaK o Jurkat.

La invención también describe un método para producir una región Fc de cadena única (sFc) de una inmunoglobulina G, que comprende la mutación, sustitución o delección de la Cys en una región bisagra de Fc de IgG. En una realización, la Cys se sustituye por Ser, Gly, The, Ala, Val, Leu, Ile o Met. En otra realización, se deleta la Cys. En una realización adicional, se deleta un fragmento de la bisagra.

La invención proporciona un método para producir una proteína de fusión en una célula de mamífero que comprende: (a) proporcionar una molécula bioactiva y un fragmento sFc de IgG que comprende una región bisagra, en la que la molécula bioactiva seleccionada del grupo que consiste en eritropoyetina, Factor IX, IFN α , GCSF e IFN β (b) mutar la región bisagra del fragmento sFc por sustitución y/o delección de aminoácidos para formar una región bisagra mutada de un Fc mutado sin formación de un puente disulfuro, y (c) combinar la molécula bioactiva y el fragmento sFc mutado a través de la región bisagra mutada, en donde la región bisagra mutada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23-60, y en donde la proteína de fusión es un monómero incapaz de formar un dímero.

b. Uso de la proteína de fusión

La proteína de fusión de la invención se puede administrar por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o a través de cualquier superficie mucosal, por ejemplo, por vía oral, sublingual, bucal, sublingual, nasal, rectal, vaginal o pulmonar.

La dosis de la proteína de fusión de la invención variará en función del sujeto y del modo particular de administración. La dosis requerida variará en función de una serie de factores conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, entre otros, la proteína de fusión, la especie del sujeto y el tamaño del sujeto. La dosificación puede estar en el rango de 0,1 y 100.000 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal. La proteína de fusión se puede administrar en una dosis única, en dosis múltiples a lo largo de un periodo de 24 horas o por infusión continua. La proteína de fusión se puede administrar de forma continua o en horarios específicos. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta obtenidas de modelos animales.

Otras realizaciones específicas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Proteína de fusión de Fc de cadena única de eritropoyetina (EPO-sFc)

1. Proteína de fusión

En este ejemplo, se preparó una proteína de fusión que tenía una estructura de Fórmula 1 discutida anteriormente:

(B)-(Bisagra)-(C_{H2}-C_{H3}) en donde:

la molécula bioactiva (B) es la proteína eritropoyetina (EPO) (SEQ ID NO: **65**);
la región bisagra (Bisagra) es una bisagra de IgG1 mutada (SEQ ID NO: **27**);
y (CH₂-CH₃) es un CH₂-CH₃ de IgG1 (SEQ ID NO: **62**).

La secuencia completa de aminoácidos de la proteína de fusión EPO-sFc se muestra en el Listado de Secuencias como la SEQ ID NO: **66**.

2. Vector de expresión

La EPO-sFc se produjo usando un vector de expresión de ADN. El fragmento de ADN de la proteína de fusión Fc de cadena única de la eritropoyetina (EPO-sFc) se ensambló usando cebadores superpuestos por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de ensamblaje. A continuación, el fragmento EPO-sFc ensamblado se ligó en los sitios Pac I y Eco RV del vector pZD (pcDNA3.1Neo, Invitrogen, Carlsbad, CA, No. Cat. V790-20 con gen dhfr) para obtener pZD/EPO-sFc como se muestra en la **Figura 2** y posteriormente se transformó en *E. coli*. La construcción del vector de expresión contenía el gen de resistencia a la zeocina como marcador de selección.

Ejemplo 2

Establecimiento de líneas celulares recombinantes estables productoras de EPO-sFc

Las células CHO_{dhfr} se tripsinizaron y resuspendieron a una concentración de 3×10⁶ células/mL en amortiguador CP-T (Cyto pluse, No. Cat. CP-T). Se transfectaron 0,2 mL de suspensión celular (6×10⁵ células) con 10 µg del plásmido pZD/EPO-sFc por electroporación (electroporador PA4000 PulseAgile®, Cyto Pulse Sciences). Después de 48 h de crecimiento en medio no selectivo, las transfectantes se incubaron en medio completo selectivo que contenía IMDM (por sus siglas en inglés), 10 % de suero fetal bovino, zeocina (Invitrogen, No. Cat. 1486406) y 5 nM de MTX (metotrexato, por sus siglas en inglés, Sigma, No. Cat. BCL5707V) para obtener el clon de alto rendimiento zE93. La expresión de la proteína de fusión secretada en el medio de cultivo se detectó y cuantificó por Q-ELISA (por sus siglas en inglés, Quantikine® IVD® Epo ELISA kit).

Las células zE93 originales se cultivaron en una placa de 10 cm con IMDM suplementado con 10 % de FBS (por sus siglas en inglés), zeocina y 0,1 µM de MTX. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C humidificada con 95 % de aire/5 % de CO₂ (Modelo 3326, Forma científico). Para adaptar las células a un medio de cultivo sin suero, se cambió el medio de IMDM a un medio JRH (por sus siglas en inglés) sin suero suplementado con 5 % de FBS, zeocina y 0,1 µM de MTX. Cuando las células se estabilizaron, se separaron de la placa de 10 cm por tripsinización y posteriormente se transfirieron a matraces oscilatorios que contenían 50 mL de medio JRH sin suero suplementado con el mismo porcentaje de FBS. Cuando la confluencia alcanzó 90 % en 3-5 días, las células se subcultivaron en matraces de centrifugación que contenían medio JRH libre de suero suplementado con un porcentaje menor de FBS. Las células se adaptaron a condiciones de suero más bajo disminuyendo gradualmente el porcentaje de FBS de 10 % a 0 % en matraces oscilatorios.

La concentración de la proteína de fusión EPO-sFc en las muestras de suero se cuantificó por el kit Quantikine® IVD® Epo ELISA (R&D Systems Inc., No. Cat. DEP00). Antes de realizar ensayos formales con la proteína de fusión, se optimizó la dilución del suero y se determinó la disposición de las placas para los estándares, los controles y las muestras. La absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirió por el software SoftMax® Pro 5.

Se obtuvieron con éxito clones de alto rendimiento por selección, dilución limitante y retos escalonados de MTX para producir finalmente la proteína de fusión que comprende la EPO recombinante enlazada a Fc de cadena única (es decir, EPO-sFc). La proteína de fusión resultante se purificó para posteriores ensayos de actividad biológica y estudios farmacocinéticos *in vitro* o *in vivo*.

Ejemplo 3

Purificación cromatográfica de EPO-sFc

Para purificar la EPO-sFc se usaron tanto resina basada en proteína A (MabSelect SuRe™) como resina DEAE (columna de intercambio aniónico DEAE FF). Después de la purificación, se analizó la tasa de recuperación correspondiente por ELISA cuantitativa, y la pureza respectiva por SDS-PAGE. A continuación se describen en detalle los procesos de purificación de EPO-sFc.

1. Purificación por MabSelect SuRe™

El medio de cultivo de la línea celular productora de EPO-sFc de alto rendimiento se aplicó a una columna MabSelect SuRe™ basada en proteína A (GE; No. Cat. 11-0034-93) con una relación de carga de

aproximadamente 4,8 mg por 1 mL de resina. Después de 2 pasos de lavado, la proteína de fusión se eluyó con un amortiguador de elución de pH 3,0 y el eluido se neutralizó posteriormente a pH 8,8. El eluido de MabSelect SuRe™ se analizó por Q-ELISA (kit Quantikine® IVD® EPO ELISA) para determinar la cantidad y la tasa de recuperación. La tasa de recuperación fue de 65,8 %, lo que indica una unión y purificación eficientes de EPO-sFc diseñada por la columna MabSelect SuRe™ de Proteína A (**Tabla 3**).

2. Purificación por DEAE FF

Antes de la carga de la columna de 1 mL de DEAE FF Hitrap, se cambió el amortiguador a amortiguador de equilibrio DEAE FF. A continuación, el medio celular que contenía EPO-sFc preparado a partir de la línea celular de alto rendimiento descrita en el Ejemplo 2 se cargó en la columna de 1 mL de DEAE FF Hitrap con una relación de carga de aproximadamente 5,92 mg por 1 mL de resina. Después de un paso de lavado ácido, el pico principal se eluyó con un amortiguador Tris 40 mM que contenía 130 mM de NaCl, pH 8,0. El eluido de DEAE FF se analizó posteriormente por Q-ELISA (kit Quantikine® IVD® EPO ELISA). La tasa de recuperación global fue de 15,48 % (**Tabla 3**).

3. Resultados

La **Tabla 3** presenta información relativa a la proteína de fusión EPO-sFc purificada con MabSelect SuRe™ y DEAE FF, respectivamente. La tabla muestra que MabSelect SuRe™ produce EPO-sFc de alta pureza eficientemente por un único paso de purificación.

La **Figura 4** muestra la proteína de fusión EPO-sFc producida usando los métodos discutidos anteriormente reveló una banda principal por el SDS-PAGE (carriles 1, 2 y 3). El MW de EPO-sFc está entre 50-70 kDa con un alto contenido de glicosilación que se demostró en un gel de SDS-PAGE duplicado por el método de tinción de ácido periódico-Schiff (PAS, por sus siglas en inglés).

El ácido siálico fue uno de los componentes importantes para que EPO-sFc afectara a su vida media en la circulación corporal. El MW de EPO-sFc está entre 50-70 kDa con un alto contenido de glicosilación. De acuerdo con la **Tabla 3**, la EPO-sFc se purificó por diferentes cromatografías, incluyendo MabSelect SuRe™ y DEAE FF, respectivamente. MabSelect SuRe™ podría producir EPO-sFc de alta pureza eficientemente por un único paso de purificación. La resina de intercambio aniónico DEAE FF permitiría pulir aún más la purificación para eliminar las isoformas de EPO-sFc con bajo contenido en ácido siálico, que podrían afectar a la vida media de EPO-sFc.

Ejemplo 4

Estudio farmacocinético de EPO-sFc

Se adquirieron diez ratas (con pesos corporales que oscilaban entre 276 y 300 g) a BioLASCO Taiwan Co., Ltd., y se les administró un tratamiento farmacocinético. Todas las ratas fueron puestas en cuarentena y aclimatadas por cuatro días antes del inicio de los estudios farmacocinéticos (PK). Las ratas se dividieron en tres grupos de prueba para los estudios PK: (1) EPO-sFc purificada por DEAE; (2) EPO-sFc purificada por Proteína A; y (3) EPO humana recombinante original (EPREX®). Las ratas de los grupos (1) y (2) recibieron una dosis de 16,8 µg/kg y las ratas del grupo (3) recibieron una dosis de 3,5 µg/kg. Las proteínas se dosificaron por administración subcutánea (S.C.). Las ratas se agruparon y se etiquetaron con tinte para pieles. Tanto la proteína de referencia (EPREX®, 3,5 µg/mL) como las proteínas de fusión de prueba EPO-sFc (resina DEAE) y EPO-sFc-(resina de proteína A) (a 16,8 µg/mL) se prepararon con diluyente de muestra fresco (0,25 % de albúmina en suero bovino (AppliChem, No. Cat. A0850,0250)) en solución salina inyectable. Todas las inyecciones se administraron a las ratas mediante la zona dorsal del cuello por vía S.C.

Se recolectaron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 5, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después de la inyección y posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se almacenó a -70 °C.

Las concentraciones de EPO en las muestras de suero se cuantificaron por el kit ELISA Quantikine® IVD® EPO (R&D Systems Inc., No. Cat. DEP00). Antes de realizar el ensayo, se optimizaron las veces de dilución del suero y se dispuso la placa para los estándares, los controles y las muestras. Las absorbancias a las longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirieron con el software SoftMax® Pro 5. Los valores de $C_{\max}$, $T_{\max}$, ABC y la vida media en la fase de eliminación ($T_{1/2}$) se calcularon a partir de las concentraciones de EPO en suero por el software PK Solutions 2.0™.

Los perfiles farmacocinéticos subcutáneos (S.C.) de EPO-sFc purificada a partir de DEAE FF y EPREX® en ratas después de la administración con dosis única se muestran en la **Figura 6** y los atributos farmacocinéticos medios se muestran en la **Tabla 5**. La vida media de EPO-sFc-DEAE fue de $22,3 \pm 0,38$ (h). En cambio, la vida media de EPREX® fue de solamente $6,182 \pm 0,675$ (horas). Las ABC de EPO-sFc (DEAE) y EPREX® fueron $327,4 \pm 15,13$ y $161,5 \pm 23,64$ (ng·h/mL), respectivamente. Los $T_{\max}$ de EPO-sFc (DEAE) y EPREX® fue de $18 \pm 0,00$ y $9,33 \pm 2,31$ (h), respectivamente.

Se ha demostrado que la vida media de EPO-sFc se prolonga hasta 3 veces en comparación con el producto de EPO original (EPREX®). La EPO-sFc de esta invención instantánea permitiría, por tanto, su uso en pacientes con enfermedad renal crónica (CKD, por sus siglas en inglés) o cáncer para disminuir la frecuencia de inyección y mejorar la calidad de vida del paciente.

Ejemplo 5

Ensayo de actividad biológica de EPO-sFc

Ocho ratones BALB/c hembra (8 semanas de edad) se dividieron en dos grupos para determinar la actividad biológica de la EPO. A un grupo se le administró la dosis del fármaco de referencia (EPREX®) y al otro la dosis de la proteína de fusión EPO-sFc de la presente divulgación (EPO-sFc). Se adquirió el fármaco de referencia (EPREX®, Johnson and Johnson) y se preparó en fresco a las concentraciones de 336 µg/mL (igual a 40 UI/mL). La proteína de fusión EPO-sFc producida de acuerdo con el Ejemplo 3 se preparó en fresco a concentraciones de 0,336 ng/mL (molar equivalente a 40 UI/mL de EPREX®). A cada ratón se le administró por vía subcutánea 0,5 mL de EPREX® o de proteína de fusión EPO-sFc el día 1, y posteriormente se realizó una extracción de sangre los días 4 a 9, 11 y 13.

El número de reticulocitos es un buen indicador de la actividad biológica de la eritropoyetina, ya que representa la producción reciente y permite determinar el recuento de reticulocitos y la potencia de la eritropoyetina. El número de reticulocitos se determinó por FACS (por sus siglas en inglés). Se añadieron 1,0 mL de PBS (por sus siglas en inglés) y 5,0 µL de sangre total a un tubo de poliestireno para la muestra sin tefir. Se añadieron 1,0 mL de naranja de tiazol (BD Retic-Count™, No. Cat. 349204) y 5,0 µL de sangre total a un tubo de poliestireno para tinción de la muestra. Ambos tubos se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente se analizaron en las 3,5 horas siguientes a la incubación. Las muestras se mezclaron suavemente inmediatamente antes del análisis. Los reticulocitos se determinaron por citometría de flujo (BD FACSCalibur™) y se analizaron con el software CellQuest Pro™. Se calculó el porcentaje de reticulocitos de cada muestra para evaluar el área de eficacia bajo la curva (ABC) y el porcentaje máximo de reticulocitos (RET_{máx}) por el software PK Solutions 2.0 (Summit, Montrose, CO, EE.UU.).

Se usaron los recuentos de reticulocitos para comparar la actividad del fármaco de referencia y de la proteína de fusión EPO-sFc midiendo el ABEC y el RET_{máx} (Tabla 7). El ABEC de 0 a 13 horas fue de 88,69 y 91,03 ng·h/mL para EPREX® y la proteína de fusión EPO-sFc, respectivamente. Adicionalmente, el RET_{máx} de EPREX® y de la proteína de fusión EPO-sFc fue de 11,12 % y de 10,48 %, respectivamente. Los resultados del ABEC y RET_{máx} sugieren que la porción Fc de cadena única de la proteína de fusión EPO-sFc no interfiere significativamente con la función de la porción EPO, ya que la actividad biológica de EPO-sFc fue comparable a la de EPREX® en este Ejemplo.

Ejemplo 6

Proteína de fusión de Fc de cadena única del factor IX (FIX-sFc)

1. Proteína de fusión

En este ejemplo, se preparó una proteína de fusión que tenía una estructura de Fórmula 1 discutida anteriormente:

(B)-(Bisagra)-(C_{H2}-C_{H3}) en donde:

la molécula bioactiva (B) es la proteína Factor IX (FIX) (SEQ ID NO: 67); la región bisagra (Bisagra) es una bisagra de IgG1 mutada (SEQ ID NO: 23); y (C_{H2}-C_{H3}) es un C_{H2}-C_{H3} de IgG1 (SEQ ID NO: 61).

La secuencia completa de aminoácidos de la proteína de fusión FIX-sFc se muestra en el Listado de Secuencias como la SEQ ID NO: 68.

2. Vector de expresión

La FIX-sFc se produjo usando un vector de expresión de ADN. El fragmento de ADN del Factor IX se ensambló usando cebadores superpuestos por el método de PCR de ensamblaje. El gen de longitud completa de la proteína de fusión Fc de cadena única del Factor IX (FIX-sFc) se amplificó a partir de la mezcla de reacción, se ligó en los sitios Pac I y Apa I del vector pZD (pcDNA3.1Neo, Invitrogen, Carlsbad, CA, No. Cat. V790-20 con gen dhfr) para obtener pZD/FIX-sFc como se muestra en la Figura 3 y posteriormente se transformó en *E. coli*. La construcción del vector de expresión contenía el gen de resistencia a la zeocina como marcador de selección.

Ejemplo 7**Establecimiento de líneas celulares recombinantes estables productoras de FIX-sFc**

Las células CHO_{dhfr} se tripsinizaron y resuspendieron a una concentración de 3×10^6 células/mL en amortiguador CP-T (Cyto pluse No. Cat. CP-T). Posteriormente, se transfectaron 0,2 mL de la suspensión celular (6×10^5 células) con 15 µg del plásmido pZD/FIX-sFc por electroporación para la expresión de rhFIX-sFc (electroporador PA4000 PulseAgile®, Cyto Pulse Sciences). Después de 48 h de crecimiento en medio no selectivo, las transfectantes se cultivaron en medio completo selectivo que contenía IMDM, 10 % de suero fetal bovino, Geneticina (Invitrogen, No. Cat. 10131-027) y 5 nM de MTX (Sigma, No. Cat. M-8407) para obtener el clon de alto rendimiento N18. Después de que las células alcanzaran la confluencia en placas de 96 pozos, el nivel de rhFIX-sFc se evaluó por Q-ELISA y los clones con alta expresión se transfirieron a una placa de 6 pozos. Estos clones se subcultivaron a 1×10^5 células por pozo y se dejaron crecer por 7 días antes de determinar el título del medio que contenía FIX-sFc por Q-ELISA.

El anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal Factor IX de ratón, Bioporto, Dinamarca, No. Cat. HYB 133-09) en 1:1000 (1 µg/mL) se preparó en amortiguador de recubrimiento de carbonato/bicarbonato para su uso. Se añadieron 100 µL del anticuerpo de captura diluido a los pozos de la placa ELISA y se incubaron a 4 °C durante la noche. Un anticuerpo de detección (Ab policlonal de factor IX de conejo, Abcam, (U.K.), No. Cat. Ab23335) se diluyó en PBST (PBS con 0,05 % de Tween 20) a 1:1,000 y se añadió a las placas ELISA. Para dar color se usó un anticuerpo conjugado con HRP (por sus siglas en inglés, Ab de peroxidasa cabra anticonejo por AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, (EE.UU.), No. Cat. 111-035-144) y un sustrato de peroxidasa TMB (por sus siglas en inglés, KPL, No. Cat. 53-00-03). Por último, se añadieron 100 µL de H₂SO₄ 1 N para detener la reacción. Las absorbancias a las longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirieron con el software SoftMax® Pro 5. La concentración de FIX-sFc se determinó por una ecuación ($X = [a/(Y - Y_0) - 1](1/b) \times X_0$), y se calcularon el valor inicial C, el valor del ABC y la vida media en la fase de eliminación ($T_{1/2}$) para la concentración de FIX-sFc usando el software PK Solutions 2.0™.

El clon original N18 se cultivó en una placa de 10 cm que contenía IMDM suplementado con 5 % de FBS, zeocina y 0,01 µM de MTX. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C humidificada con 95 % de aire/8 % de CO₂ (Modelo 3326, Forma scientific). Para que las células se adaptaran al medio libre de suero, se cambió el medio de cultivo de IMDM a medio EX-CELL® 325 PF CHO libre de suero suplementado con 2 % de FBS, zeocina y 0,02 µM de MTX. Cuando las células se estabilizaron, se separaron de la placa de 10 cm por tripsinización y posteriormente se transfirieron a matraces oscilatorios que contenían 50 mL de medio EX-CELL® 325 PF CHO libre de suero suplementado con el mismo porcentaje de FBS. Cuando la confluencia celular alcanzó 90 % en 3-5 días, las células se subcultivaron en matraces de centrifugación con el medio EX-CELL® 325 PF CHO libre de suero suplementado con un porcentaje menor de FBS. Las células se adaptaron a condiciones más bajas de suero disminuyendo gradualmente el porcentaje de FBS de 2 % a 0 % en el centrifugador. Para aumentar aún más la productividad y la actividad de rhFIX-sFc, el clon se retransfectó con pZD/FIX-sFc. Las células del clon de alto rendimiento, N18-reZB, se seleccionaron subsecuentemente por FACS para separar en el mismo el grupo de células de alto rendimiento y crecer en medio EX-CELL® 325 PF CHO libre de suero. Las células del clon N18-reZB se probaron en diferentes condiciones de MTX para seleccionar células que produjeran un alto rendimiento de rhFIX-sFc.

Después de una ronda de selección, se seleccionó un clon de alto rendimiento, N18-reZB-sp4-sp5, por un reto con MTX por Q-ELISA. Posteriormente, el clon libre de suero se retransfectó con pZD/FIX-sFc por selección y reto con MTX y se sometió a selección de función dando lugar a clones de alto rendimiento. En este proceso se obtuvo N18-reZB-sp4-sp5. El título acumulado en el cultivo por lotes de N18-reZB-sp4-sp5 fue de aproximadamente 53,4 µg/mL, como se determinado por Q-ELISA.

Ejemplo 8**Purificación cromatográfica de FIX-sFc**

Tanto la resina de proteína A (MabSelect SuRe™) como la resina IX Select se usaron para purificar FIX-sFc. Después de la purificación, se analizó la tasa de recuperación correspondiente por ELISA cuantitativa y la pureza respectiva por SDS-PAGE. A continuación se describen en detalle los procesos de purificación de la FIX-sFc.

1. Purificación por MabSelect SuRe™

El medio de cultivo de la línea celular productora de FIX-sFc se aplicó a una columna MabSelect SuRe™ basada en proteína A con una relación de carga de aproximadamente 1,84 mg para 1 mL de resina. Después de 2 pasos de lavado, la proteína de fusión se eluyó de la columna con un amortiguador de pH 3,0. El eluido de MabSelect SuRe™ se analizó por Q-ELISA para determinar la cantidad y la tasa de recuperación. La FIX-sFc fue capturado por MabSelect SuRe™ eficientemente y una purificación de un único paso ya produjo una preparación altamente purificada como se muestra en el carril 2 de la **Figura 5**.

2. Purificación por IX Select

La resina IX Select de afinidad (GE; No. Cat. 17-5505-01) se empaquetó en una columna de 1 mL. La resina se acopló con anticuerpo monoclonal dirigido contra FIX. El rango de pH de carga fue de 6,5-8,0. El medio para FIX-sFc se cargó en la columna IX Select sin intercambio de amortiguador. La relación de carga fue de aproximadamente 1,69 mg para 1 mL de resina. Después de un paso de lavado para eliminar los materiales no unidos, el pico principal se eluyó con un amortiguador de 20 mM Tris que contenía 2 M de $MgCl_2$, pH 7,4. A continuación, el eluido de IX Select se analizó por Q-ELISA.

3. Resultados

La **Tabla 4** presenta información relativa a la proteína de fusión FIX-sFc purificada con resina de afinidad MabSelect SuRe™ e IX Select, respectivamente. La tabla muestra que MabSelect SuRe™ e IX Select producen FIX-sFc de alta pureza eficientemente por un único paso de purificación.

La **Figura 5** muestra que la proteína de fusión FIX-sFc producida usando los métodos discutidos anteriormente reveló una banda principal por el SDS-PAGE (carriles 1 y 2). El MW de Factor IX-sFc se situaba entre 100-110 kDa con un alto contenido de glicosilación que se puso de manifiesto en un gel SDS-PAGE duplicado por el método de tinción de ácido periódico-Schiff (PAS). La tasa de recuperación de MabSelect SuRe™ e IX Select fue de 88,34 % y 20,05 %, respectivamente (**Tabla 4**). La cromatografía en columna MabSelect SuRe™ basada en Proteína A purificó FIX-sFc eficientemente en un único paso con alto rendimiento y pureza como se muestra en la **Figura 5** debido a la inesperada propiedad de unión a Proteína A/G de la sFc de la proteína de fusión diseñada FIX-sFc.

Ejemplo 9

Estudios farmacocinéticos de FIX-sFc

Ocho ratas SD, con un peso de 315-375 g, fueron adquiridas a BioLASCO Taiwan Co., Ltd. Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos para los estudios farmacocinéticos (PK): (1) FIX recombinante (BeneFIX®) como fármaco de referencia; y (2) FIX-sFc de la presente divulgación. A las ratas de los grupos (1) y (2) se les administró una dosis de 1 mg/kg mediante la vena de la cola el Día 0. Después de la inyección, las ratas fueron sangradas a las 0, 0,25, 4, 8, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la inyección según el programa de pruebas. Las muestras de sangre libre de coagulantes se colocaron a temperatura ambiente por al menos 30 minutos y el suero se aisló por centrifugación a 3.000 rpm por 20 minutos. Las muestras de suero se tomaron alícuotas y se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

El anticuerpo de captura diluido (anticuerpo monoclonal del Factor IX de ratón, Bioporto, Dinamarca, No. Cat. HYB 133-09) en 1:1000 (1 µg/mL) se preparó usando un amortiguador de recubrimiento de carbonato/bicarbonato. Una cápsula amortiguadora (Sigma, No. Cat. C-3041) se disolvió en 100 mL de ddH₂O para obtener un amortiguador a 0,05 M, pH 9,6, se filtró con un filtro de 0,2 µm y se almacenó a 4 °C. Se añadieron 100 µL del anticuerpo capturado diluido en pozos de la placa ELISA y se incubaron a 4 °C durante la noche. Las placas se bloquearon usando 200 µL de amortiguador de bloqueo (PBS, pH 7,2 con 2,0 % de BSA, por sus siglas en inglés), y se lavaron 3 veces con 200 µL de PBS (PBS, pH 7,2). Se añadieron 100 µL de BeneFIX® (100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,125 ng/mL y 1,5625 ng/mL) y FIX-sFc a las concentraciones correspondientes a cada pozo ELISA, respectivamente, y se incubaron a 37 °C por 1 hora. Las placas ELISA se lavaron posteriormente 3 veces con 200 µL de PBST (PBS con 0,05 % de Tween 20). Un anticuerpo de detección (Ab policlonal de factor IX de conejo, Abcam, (U.K.), No. Cat. Ab23335) se diluyó en PBST (PBS con 0,05 % de Tween 20) en una proporción de 1:1.000 y se añadió a las placas ELISA. Después de la incubación, las placas ELISA se lavaron 3 veces con PBST. Se añadieron a las placas el anticuerpo conjugado HRP (Ab de peroxidasa cabra anticonejo por AffiniPure, Jackson ImmunoResearch, (EE.UU.), No. Cat. 111-035-144) y el sustrato de peroxidasa TMB (KPL, No. Cat. 53-00-03) para producir el color. Por último, se usaron 100 µL de H₂SO₄ 1 N para detener la reacción. Las absorbancias del suero diluido a las longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirieron por el software SoftMax® Pro 5. La concentración de FIX-sFc se determinó usando una ecuación ($X = [a/(Y - Y_0) - 1]/(1/b) \times X_0$). El valor de C inicial, el valor del ABC y la vida media en la fase de eliminación ($T_{1/2}$) se calcularon por la concentración de FIX-sFc usando el software PK Solutions 2.0™.

Los perfiles farmacocinéticos intravenosos (I.V.) de FIX-sFc purificado de MabSelect SuRe™ y BeneFIX® en ratas después de la administración con una dosis única se muestran en la **Figura 7** y los atributos farmacocinéticos medios se muestran en la **Tabla 6**. Las vidas medias de FIX-sFc y BeneFIX® fue de $56,0 \pm 13,1$ y $11,91 \pm 2,54$ (h), respectivamente. Las ABC de FIX-sFc y BeneFIX® fueron $19080,3 \pm 2606,4$ y $46594,40 \pm 3634,08$ (ng·h/mL), respectivamente. Las C iniciales de FIX-sFc y BeneFIX® fueron $4668,0 \pm 447,5$ y $11790,98 \pm 4898,85$ (ng/mL), respectivamente.

La vida media de FIX-sFc de la presente invención fue de aproximadamente 56 horas en ratas con administración intravenosa, que es 5 veces más larga que la de BeneFIX® ($11,91 \pm 2,54$ horas). La FIX-sFc es, por lo tanto, un fármaco de acción prolongada para pacientes con hemofilia que disminuye la frecuencia de las inyecciones y

mejora la calidad de vida del paciente. Los datos farmacocinéticos indicaron que FIX-sFc de la invención podría unirse al receptor Fc, resultando en una menor concentración inicial C y ABC y liberarse lentamente de vuelta al torrente sanguíneo, resultando en su vida media más larga.

5 **Ejemplo 10**

Ensayo de actividad biológica de FIX-sFc

Se usó la prueba de Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (APTT, por sus siglas en inglés) para determinar la actividad biológica de FIX-sFc. Brevemente, el fármaco de referencia (BeneFIX®, Wyeth) y FIX-sFc se prepararon en fresco y se diluyeron en plasma deficiente de Factor IX (Haematologic Technologies, Inc) a concentraciones de 10, 5 y 2,5 µg/mL (volumen final = 500 µL). Las muestras (BeneFIX® o FIX-sFc) se mezclaron posteriormente con un volumen igual de reactivo Dade® Actin® FSL (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH) y se incubaron a 37 °C por 3 min. Por último, se añadió CaCl₂ para detener la reacción de coagulación y observar la formación del coágulo. El tiempo de coagulación y la actividad específica se registraron y calcularon por el método de líneas paralelas (análisis PLA, por sus siglas en inglés).

Como se muestra en la **Tabla 8**, el tiempo de coagulación dependió de la concentración de BeneFIX® o FIX-sFc. El resultado promedio de APTT fue de 30,1, 26,2, y 25,5 s para FIX-sFc en la concentración de 2,5, 5,0, y 10,0 µg/mL, respectivamente. Como se muestra en la **Tabla 8**, FIX-sFc tenía una potencia relativa y una actividad específica similares en comparación con BeneFIX®. La FIX-sFc mantuvo una actividad biológica equivalente a BeneFIX®, lo que sugiere que la cadena única Fc no interfiere con la función de FIX en la proteína de fusión.

25 **Ejemplo 11**

Proteína de fusión Fc de cadena única del interferón alfa (IFNα-sFc)

1. Proteína de fusión

En este ejemplo, se preparó una proteína de fusión que comprende interferón alfa (IFNα) y se usó subsecuentemente en ejemplos posteriores. El IFNα es un ejemplo representativo de la gran familia de moléculas IFNα.

Específicamente, se preparó una proteína de fusión de cadena única IFNα (IFNα-sFc) que tenía una estructura de fórmula 1 discutida anteriormente:

(B)-(Bisagra)-(C_H2-C_H3) en donde:

la molécula bioactiva (B) es la proteína interferón alfa (IFNα) (SEQ ID NO: **69**);
la región bisagra (Bisagra) es una bisagra de IgG1 mutada (SEQ ID NO: **23**); y
(C_H2-C_H3) es un C_H2-C_H3 de IgG1 (SEQ ID NO: **62**).

La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína de fusión IFNα-sFc se muestra en el listado de secuencias como la SEQ ID NO: **70**.

2. Vector de expresión

La IFNα-sFc se produjo usando un vector de expresión de ADN. El fragmento de ADN de IFNα-sFc se ensambló usando cebadores superpuestos por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ensamblaje. El fragmento de IFNα-sFc ensamblado se ligó posteriormente a los sitios Pac I y Eco RV del vector pZD (pcDNA3.1Neo, Invitrogen, Carlsbad, CA, No. Cat. V790-20 con gen dhfr) para obtener pZD/IFNα-sFc como se muestra en la **Figura 8** y posteriormente se transformó en *E. coli*. El constructo del vector de expresión contenía el gen de resistencia a la zeocina como marcador seleccionado.

55 **Ejemplo 12**

Establecimiento de líneas celulares recombinantes estables productoras de IFNα-sFc

Las células CHO_{dhfr} se tripsinizaron y resuspendieron a una concentración de 3×10⁶ células/mL en amortiguador CP-T (Cyto pluse, No. Cat. CP-T). Se transfectaron 0,2 mL de suspensión celular (6×10⁵ células) con 10 µg del plásmido pZD/IFNα-sFc por electroporación (electroporador PA4000 PulseAgile®, Cyto Pulse Sciences). Después de 48 h de crecimiento en medio no selectivo, las transfectantes se incubaron en medio completo selectivo que contenía IMDM, 10 % de suero fetal bovino, zeocina (Invitrogen, No. Cat. 1486406) y 5 nM de MTX (Sigma, No. Cat. BCL5707V) para obtener el clon de alto rendimiento 22-123-327-117-Re117. La expresión de la proteína de fusión secretada en el medio de cultivo se detectó y cuantificó por Q-ELISA.

Las células 22-123-327-117-Re117 originales se cultivaron en una placa de 10 cm que contenía IMDM suplementado con 10 % de FBS, zeocina y 0,1 μ M de MTX. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C humidificada con 95 % de aire/5 % de CO₂ (Modelo 3326, Forma scientific). Para adaptar las células a un medio de cultivo sin suero, se cambió el medio de IMDM a un medio JRH sin suero suplementado con 5 % de FBS, zeocina y 0,1 μ M de MTX. Cuando las células se estabilizaron, se separaron de la placa de 10 cm por tripsinización y posteriormente se transfirieron a matraces oscilatorios que contenían 50 mL de medio JRH sin suero suplementado con el mismo porcentaje de FBS. Cuando la confluencia alcanzó 90 % en 3-5 días, las células se subcultivaron en matraces oscilatorios que contenían medio JRH libre de suero suplementado con un porcentaje menor de FBS. Las células se adaptaron a condiciones de suero más bajo disminuyendo gradualmente el porcentaje de FBS de 10 % a 0 % en matraces oscilatorios.

La concentración de la proteína de fusión IFN α -sFc en las muestras de suero se cuantificó por un kit ELISA interno para IFN α -sFc. La absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirió por el software SoftMax® Pro 5. Se obtuvieron con éxito clones de alto rendimiento por selección, dilución limitante y desafíos escalonados de MTX para producir finalmente la proteína de fusión que comprende el IFN α 8 recombinante enlazado a Fc de cadena única (es decir, IFN α -sFc). La proteína de fusión resultante se purificó para posteriores ensayos de actividad biológica y estudios farmacocinéticos *in vitro* o *in vivo*.

Ejemplo 13

Purificación cromatográfica de IFN α -sFc

Se usó resina basada en proteína A (MabSelect SuRe™) para purificar IFN α -sFc. Después de la purificación, se analizó la tasa de recuperación correspondiente por ELISA cuantitativa, y la pureza respectiva por SDS-PAGE. A continuación se describen los procesos detallados de purificación de la proteína de fusión IFN α -sFc.

1. Purificación por MabSelect SuRe™

El medio de cultivo de la línea celular productora de IFN α -sFc de alto rendimiento se aplicó a una columna MabSelect SuRe™ basada en proteína A (GE; No. Cat. 11-0034-93) con una relación de carga de aproximadamente 4,6 mg por 1 mL de resina. Después de 2 pasos de lavado, la proteína de fusión se eluyó con el amortiguador de elución con 0,1 M de glicina a pH 3,0. El pico principal se eluye con el amortiguador de elución. El eluido de MabSelect SuRe™ se analizó por Q-ELISA para determinar la cantidad y la tasa de recuperación.

2. Resultados

La IFN α -sFc se purificó por MabSelect SuRe™ usando diferentes condiciones de amortiguador. Los resultados mostraron que el amortiguador de elución con 0,1 M de glicina a pH 3,0 podía purificar IFN α -sFc eficientemente con alta pureza para la determinación posterior de las propiedades fisicoquímicas. Los eluidos de las muestras de IFN α -sFc purificadas se analizaron por SDS-PAGE como se muestra en la **Figura 9**, que reveló IFN α -sFc purificada como banda principal en todos los amortiguadores evaluados. Se usaron aditivos estabilizadores (sacarosa o urea) en el amortiguador de elución para prevenir la precipitación. Algunas impurezas de bajo peso molecular aparecieron cuando se usó urea como aditivo en el amortiguador. Se observó que la pureza de IFN α -sFc en el amortiguador de elución de glicina con un aditivo de sacarosa fue > 95 %.

Ejemplo 14

Estudio farmacocinético de IFN α -sFc

Se adquirieron ocho ratas, con un peso de 276-300 g, a BioLASCO Taiwan Co., Ltd., que las sometió a cuarentena y las aclimató por cuatro días antes de iniciar los estudios farmacocinéticos (PK). Todas las ratas fueron puestas en cuarentena y aclimatadas por cuatro días antes del inicio de los estudios farmacocinéticos (PK). Las ratas se dividieron en cuatro grupos de prueba para los estudios de PK: (1) Pegasys® (IFN α pegilado), (2) IFN α -sFc de esta divulgación, (3) Peg-Intron® (IFN α pegilado), y (4) Roferon-A® (IFN α recombinante). Las ratas fueron dosificadas a 310 pmol/kg, lo que se convirtió equivalentemente en 18,6 μ g/kg para Pegasys®, 13,95 μ g/kg para IFN α -sFc, 9,7 μ g/kg para Peg-Intron® y 5,89 μ g/kg para Roferon-A®. Todos los artículos se prepararon en fresco con diluyentes de muestra frescos, albúmina bovina en suero al 0,2 % (AppliChem, No. Cat. A0850,0250) en solución salina amortiguada con fosfato. Las ratas se agruparon y se etiquetaron con tinte para pieles. Todas las inyecciones se administraron a las ratas mediante la zona dorsal del cuello por vía subcutánea (S.C.).

Se recolectaron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 192, 240, 288 y 336 horas después de la inyección, respectivamente, y posteriormente se centrifugaron a 3.000 rpm por 20 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C. Se recolectaron y almacenaron muestras de sangre adicionales para las ratas dosificadas con Roferon-A® a las 0,08, 0,25 y 8 horas después de la inyección.

La concentración de interferón en las muestras de suero se cuantificó por el método ELISA. Antes de realizar el

ensayo, se optimizaron las veces de dilución del suero y se dispuso la placa para los estándares, los controles y las muestras. Las absorbancias a las longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirieron con el software SoftMax® Pro 5. Los valores de $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$ y ABC y la vida media en la fase de eliminación ($T_{1/2}$) a partir de las concentraciones de IFN en suero se calcularon por el software PK Solutions 2.0™.

Los perfiles farmacocinéticos subcutáneos (S.C.) de los diferentes Grupos de tratamiento tras la administración con dosis única se muestran en la **Figura 10** con sus atributos farmacocinéticos medios mostrados en la **Tabla 9**. La vida media de Pegasys®, IFNα-sFc, Peg-Intron® y Roferon-A® fue de 23,2, 50,2, 20,8 y 0,73 horas, respectivamente. Las ABC de Pegasys®, IFNα-sFc, Peg-Intron® y Roferon-A® fueron de 64694,5, 60621,9, 5307,6 y 489,2 pM/h, respectivamente. El $T_{\text{máx}}$ de Pegasys®, IFNα-sFc, Peg-Intron® y Roferon-A® fue de 32,0, 32,0, 6,0 y 0,67 horas, respectivamente.

Roferon-A® es un producto de IFNα recombinante de primera generación. Pegasys® y Peg-Intron® son productos de segunda generación de IFNα, con PEG (polietilenglicol, por sus siglas en inglés) acoplado al IFNα nativo. Se ha demostrado anteriormente que la inclusión de PEG prolonga significativamente la vida media del IFNα en comparación con la forma no pegilada. El aumento de la vida media por el PEG también se observó en este Ejemplo, como muestran los datos farmacocinéticos recogidos en la **Tabla 9** y la **Figura 10** (comparar los datos de Pegasys® y Peg-Intron® con los de Roferon-A®).

La **Tabla 9** y la **Figura 10** muestran también que la vida media del IFNα se prolonga aún más, en comparación con Pegasys®, Peg-Intron® y Roferon-A®, cuando está presente en una proteína de fusión Fc de cadena única de la presente divulgación. En concreto, la vida media del IFNα-sFc es más de 2 veces mayor a la de los dos interferones pegilados (Pegasys® y Peg-Intron®) y más de 68 veces mayor a la del IFNα recombinante (Roferon-A®).

Ejemplo 15

Ensayo de actividad biológica de IFNα-sFc

La actividad antiviral del IFN se determinó por un ensayo de inhibición del efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés). En resumen, los pozos de las placas de 96 pozos se sembraron con $1,0 \times 10^4$ células A549 y se incubaron a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ por 24 horas. Cuando el crecimiento celular formó monocapas confluentes, las células se trataron con varias concentraciones y formas de IFNα. Se prepararon diluciones seriadas quíntuplas de los IFN a partir de una concentración de 178 ng/mL. El volumen final de IFN añadido a los pozos fue de 100 µL. Después de 24 horas, se eliminó el medio y las células se infectaron con el virus de la encefalomiocarditis murina (EMCV, por sus siglas en inglés) a un título de 6×10^4 UFP/mL y se incubaron por 24 horas. Se observó un efecto citopático (CPE) en los pozos de control del virus sin interferón. Se añadieron 20 µL de solución de MTS (por sus siglas en inglés) a cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ por 3 horas. Las células teñidas se analizaron por espectrofotometría a una OD (por sus siglas en inglés) de 490 nm en un lector de placas automatizado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó la media global.

El porcentaje de inhibición del CPE viral a cada concentración de IFN se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\text{"Inhibición (\%)} = (OD \text{ de pozo de prueba} - OD \text{ de control de virus}) / (OD \text{ de control celular} - OD \text{ de control de virus})"$$

Se calculó una curva logística de cuatro parámetros y una dosis de inhibición de la replicación viral de 50 % por el programa informático Sigma Plot.

Además, se comparó la actividad antiviral de IFNα-sFc (fragmento sFc incapaz de formar dímero unido por un puente disulfuro) con IFNα-Fc (fragmento sFc capaz de formar dímero unido por un puente disulfuro) y los resultados se muestran en la **Figura 11** y la **Tabla 10**. La actividad antiviral de IFN-α-sFc ($IC_{50} = 0,0061$ nM) fue 5,1 veces mayor a la de IFN-α-Fc ($IC_{50} = 0,0313$ nM) y 14,7 veces mayor a la de Pegasys® ($IC_{50} = 0,0894$).

Resumen

Los resultados obtenidos en los Ejemplos 14 y 15 demuestran que la proteína de fusión Fc de cadena única de IFNα de la presente divulgación (IFNα-sFc) tiene propiedades biológicas mejoradas y ventajas en comparación con otros productos de IFNα, incluyendo: (1) reducción del coste de producción al aumentar el rendimiento de la purificación a través de cromatografía de proteína A, (2) potenciación de la actividad antiviral, (3) prolongación de la vida media en suero, lo que resulta en una disminución de la frecuencia de las dosis, y (4) reducción del aclaramiento renal. Aunque la vida media de una proteína de fusión Fc dimerizada tradicional (IFNα-Fc) (fragmento sFc capaz de formar dímero unido por un puente disulfuro) y de Pegasys® se prolongó en comparación con Roferon-A®, sus actividades biológicas fueron menores a las de IFNα-sFc. Es probable que la menor actividad biológica observada con IFNα-Fc y Pegasys® se deba, al menos en parte, al impedimento estérico de la unión del receptor con las moléculas de fusión de mayor tamaño (es decir, el fragmento de sFc capaz de formar un dímero unido por un puente disulfuro en IFNα-Fc y la cadena de PEG ramificada de 40 kDa en Pegasys®).

Los resultados mostrados en las **Figuras 10-11** y las **Tablas 9-10** demuestran que la modificación de Fc de cadena única de la presente divulgación produce un IFN α que tiene una vida media prolongada y una actividad biológica potenciada en comparación con otras formas de IFN α . Estos resultados sugieren que la modificación de la presente invención se puede usar para producir composiciones farmacéuticas altamente potentes y eficientes que contengan tratamientos basados en péptidos y proteínas.

Ejemplo 16

Comparación de las afinidades de unión respectivas de IFN α -sFc (fragmento de sFc capaz de formar dímero unido por un puente disulfuro) e IFN α -Fc (dímero) al receptor de interferón alfa 1 (IFNAR1) y al receptor de interferón alfa 2 (IFNAR2)

Las afinidades de unión de las proteínas de fusión de interferón se determinaron por un ensayo cinético/de afinidad.

Brevemente, 5 μ g/mL de rhIFN alfa receptor 2 (IFNAR2) (Sino biotechnology, No. Cat. 10359-H08H) preparado en amortiguador de inmovilización (amortiguador de acetato de sodio 10 mM, pH 4,0). El rhIFNAR2 (R_L = 800 UR) se inmovilizó en un chip sensor CM5 (GE, No. Cat. BR-1003-99) a través de un acoplamiento convencional de aminas en una máquina de resonancia de plasmón superficial (SPR) (GE, Modelo: Biacore X100). Las soluciones de muestra que contenían de 12,5 a 200 nM de IFN α -sFc o IFN α -Fc se prepararon por una dilución en serie de 2 veces con amortiguador de ejecución (PBS con 0,005 % de Tween 20, pH 7,4). Las soluciones preparadas en los pasos anteriores se diluyeron en series de 2 veces con amortiguador de ejecución para preparar soluciones de inyección única de 6,25 a 100 nM de IFN α -sFc o IFN α -Fc. Posteriormente, se añadieron 200 nM de IFN-alfa receptor 1 (IFNAR1) (Sino biotechnology, No. Cat. 13222-H08H) se mezcló con un volumen igual de solución de inyección única de IFN preparada en el paso anterior para preparar la mezcla IFN-IFNAR1. La concentración de IFNAR1 fue de 100 nM, mientras que la concentración de IFN α -sFc o IFN α -Fc estuvo en el rango de 6,25 nM a 100 nM. Los valores de la constante de asociación de equilibrio (K_a) y la constante de disociación de equilibrio (K_d) de IFN α -sFc o IFN α -Fc se analizaron por el software BIAevaluation para calcular los valores de la constante de unión (K_D) por la K_d y la K_a .

Como se muestra en las **Figuras 12A-12B**, IFN α -sFc-IFNAR1 e IFN α -Fc-IFNAR1 tenían perfiles de unión similares. Específicamente, la **Tabla 11** muestra que las asociaciones de unión de los IFNs fueron relativamente similares, teniendo IFN α -sFc una K_a de $1,4E+06$ 1/Ms y IFN α -Fc una K_a de $3,3E+06$ 1/Ms, respectivamente. Sin embargo, en la etapa de disociación, IFN α -sFc-IFNAR1 presentaba un perfil de disociación (K_d) más lento que el de IFN α -Fc-IFNAR1. Como se muestra en la **Tabla 11**, la disociación (K_d) de IFN α -sFc e IFN α -Fc de IFNAR1 fue de $5,6E-03$ y $5,6E-02$ 1/s, respectivamente. Se determinó que la afinidad de interacción (K_D) de IFN α -sFc e IFN α -Fc con IFNAR fue de $4,0E-09$ y $1,7E-08$ nM, respectivamente, basado en los perfiles de asociación (K_a) y disociación (K_d) observados. Por lo tanto, la afinidad de IFN α -sFc fue 4,25 veces mayor que la de IFN α -Fc para formar los complejos ternarios.

Los resultados de afinidad de unión observados en este Ejemplo apoyan aún más la teoría discutida en el Ejemplo anterior de que IFN α -sFc ha potenciado las actividades biológicas, en comparación con IFN α -Fc, probablemente debido a un menor impedimento estérico en la unión al receptor para el fragmento sFc incapaz de formar dímero unido por un puente disulfuro en comparación con el fragmento sFc incapaz de formar dímero unido por un puente disulfuro.

Ejemplo 17

Proteína de fusión Fc de cadena única del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF-sFc)

1. Proteína de fusión

En este ejemplo, se preparó una proteína de fusión que tenía una estructura de Fórmula 1 discutida anteriormente:

(B)-(Bisagra)-(C_{H2}-C_{H3}) en donde:

la molécula bioactiva (B) es la proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) (SEQ ID NO: **71**);

la región bisagra (Bisagra) es una bisagra de IgG1 mutada (SEQ ID NO: **23**); y

(C_{H2}-C_{H3}) es un C_{H2}-C_{H3} de IgG1 (SEQ ID NO: **72**).

La secuencia completa de aminoácidos de la proteína de fusión GCSF-sFc se muestra en el Listado de Secuencias como la SEQ ID NO: **72**.

2. Vector de expresión

La GCSF-sFc se produjo usando un vector de expresión de ADN. El fragmento de ADN de la proteína de fusión Fc de cadena única del factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF-sFc) se ensambló usando cebadores superpuestos por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ensamblaje. El fragmento GCSF-sFc ensamblado se ligó posteriormente a los sitios Pac I y Eco RV del vector pZD (pcDNA3.1Neo, Invitrogen, Carlsbad, CA, No. Cat. V790-20 con gen dhfr) para obtener pZD-GCSF-sFc como se muestra en la **Figura 13** y posteriormente se transformó en *E. coli*. La construcción del vector de expresión contenía el gen de resistencia a la zeocina como marcador de selección.

Ejemplo 18

Establecimiento de líneas celulares recombinantes estables productoras de GCSF-sFc

Las células CHO_{dhfr} se tripsinizaron y resuspendieron a una concentración de 3×10^6 células/mL en amortiguador CP-T (Cyto pluse, No. Cat. CP-T). Se transfectaron 0,2 mL de suspensión celular (6×10^5 células) con 10 µg del plásmido pZD-GCSF-sFc por electroporación (electroporador PA4000 PulseAgile®, Cyto Pulse Sciences). Después de 48 h de crecimiento en medio no selectivo, las transfectantes se incubaron en medio completo selectivo que contenía IMDM, 10 % de suero fetal bovino, zeocina (Invitrogen, No. Cat. 1486406) y 5 nM de MTX (Sigma, No. Cat. BCL5707V) para obtener el clon de alto rendimiento zG3-17-41. La expresión de la proteína de fusión secretada en el medio de cultivo se detectó y cuantificó por Q-ELISA.

Las células zG3-17-41 originales se cultivaron en una placa de 10 cm con IMDM suplementado con 10 % de FBS, zeocina y 0,1 µM de MTX. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C humidificada con 95 % de aire/5 % de CO₂ (Modelo 3326, Forma scientific). Para adaptar las células a un medio de cultivo sin suero, se cambió el medio de IMDM a un medio JRH sin suero suplementado con 5 % de FBS, zeocina y 0,1 µM de MTX. Cuando las células se estabilizaron, se separaron de la placa de 10 cm por tripsinización y posteriormente se transfirieron a matraces oscilatorios que contenían 50 mL de medio JRH sin suero suplementado con el mismo porcentaje de FBS. Las células se adaptaron a condiciones de suero más bajo disminuyendo gradualmente el porcentaje de FBS de 10 % a 0 % en matraces oscilatorios.

La concentración de la proteína de fusión GCSF-sFc en las muestras de suero se cuantificó por un análisis ELISA de GCSF-sFc. La absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirió por el software SoftMax® Pro 5. Se obtuvieron con éxito clones de alto rendimiento por selección, dilución limitante y retos escalonados de MTX para producir finalmente la proteína de fusión que comprende la GCSF recombinante enlazada a Fc de cadena única (es decir, GCSF-sFc). La proteína de fusión resultante se purificó para posteriores ensayos de actividad biológica y estudios farmacocinéticos *in vitro* o *in vivo*.

Ejemplo 19

Purificación cromatográfica de GCSF-sFc

Se usó resina basada en proteína A (MabSelect SuRe™) para purificar GCSF-sFc. Después de la purificación, se analizó la tasa de recuperación correspondiente por ELISA cuantitativa, y la pureza respectiva por SDS-PAGE. A continuación se describe detalladamente el proceso de purificación del GCSF-sFc.

Purificación por MabSelect SuRe™

El medio de cultivo de la línea celular productora de GCSF-sFc de alto rendimiento se aplicó a una columna MabSelect SuRe™ basada en proteína A (GE; No. Cat. 11-0034-93) con una relación de carga de aproximadamente 3,4 mg por 1 mL de resina. Después de 2 pasos de lavado, la proteína de fusión se eluyó con el amortiguador de elución con 0,1 M de glicina a pH 3,0. El pico principal eluido se analizó por HPLC de fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés). El eluido de MabSelect SuRe™ también se analizó por Q-ELISA para determinar la cantidad y la tasa de recuperación. Los eluidos de la muestra de GCSF-sFc purificada también se analizaron por SDS-PAGE. La **Figura 14** muestra la proteína de fusión GCSF-sFc revelada como banda principal por el SDS-PAGE. En resumen, la GCSF-sFc pudo ser capturado por MabSelect SuRe™ eficientemente.

Ejemplo 20

Estudio farmacocinético de GCSF-sFc

Nueve ratas, con un peso de 180-200 g, se adquirieron a BioLASCO Taiwan Co., Ltd., y se sometieron a cuarentena y aclimatación por cuatro días antes de iniciar los estudios farmacocinéticos (PK). Todas las ratas fueron puestas en cuarentena y aclimatadas por cuatro días antes del inicio de los estudios farmacocinéticos (PK). Las ratas se dividieron en tres grupos de prueba para los estudios de PK: (1) GCSF-sFc, (2) Lenograstim (Granocyte®), un GCSF recombinante, y (3) Peg-filgrastim (Neulasta®), una forma pegilada de GCSF humano recombinante. Las ratas recibieron una dosis de 221,43 µg/kg de GCSF-sFc y una equivalencia molar de 100 µg/kg de Lenograstim y Peg-filgrastim. Todos los productos de GCSF se prepararon en fresco con diluyentes de muestra, albúmina en

suelo bovino al 0,2 % (AppliChem, No. Cat. A0850,0250) en solución salina amortiguada con fosfato. Las ratas se agruparon y se etiquetaron con tinte para pieles. Todas las inyecciones se administraron a las ratas mediante la zona dorsal del cuello por vía subcutánea (S.C.).

- 5 Se recolectaron muestras de sangre a los 5 min, 0,5, 1, 2, 3, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas después de la inyección, respectivamente, y posteriormente se centrifugaron a 3.000 rpm por 20 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C.

10 Las concentraciones de GCSF en las muestras de suero se cuantificaron por el método ELISA usando anticuerpos pareados (R&D System, No. Cat. MAB214 y Sistema R&D, No. Cat. BAF214) para unir y detectar GCSF. Antes de realizar el ensayo, se optimizaron las veces de dilución del suero y se dispuso la placa para los estándares, los controles y las muestras. Las absorbancias a las longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirieron con el software SoftMax® Pro 5. Los valores de $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$ y ABC y la vida media en la fase de eliminación ($T_{1/2}$) a partir de las concentraciones de GCSF en suero se calcularon por el software PK Solutions 2.0™.

15 Los perfiles farmacocinéticos subcutáneos (S.C.) de los GCSF respectivos en ratas tras la administración de una dosis única se muestran en la **Figura 15** con sus atributos farmacocinéticos medios mostrados en la **Tabla 12**. La vida media de GCSF-sFc, Lenograstim y Peg-filgrastim fue de 17,16, 4,1 y 12,0 horas, respectivamente. La $C_{\text{máx}}$ de GCSF-sFc, Lenograstim y Peg-filgrastim fue de 906,9, 156,4 y 480,8 ng/mL, respectivamente. El $T_{\text{máx}}$ de GCSF-sFc, Lenograstim y Peg-filgrastim fue de 48, 0,5 y 10,3 horas, respectivamente. El ABC de GCSF-sFc, Lenograstim y Peg-filgrastim fue de 50624, 790-1292 y 23202 ± 2921 ng·h/mL, respectivamente.

20 El Lenograstim es un producto de GCSF recombinante de primera generación. El Peg-filgrastim es un producto de segunda generación de GCSF acoplado a PEG (polietilenglicol). Se ha demostrado anteriormente que la inclusión de PEG prolonga la vida media del GCSF en comparación con el producto de primera generación (Lenograstim). El aumento de la vida media del GCSF con PEG también se observó en este Ejemplo, como se muestra en los datos farmacocinéticos recolectados en la **Tabla 12** y en la **Figura 15** (comparar los datos para Lenograstim con los datos para Peg-filgrastim).

25 La **Tabla 12** y la **Figura 15** muestran también que la vida media del GCSF se prolonga aún más, en comparación con el Lenograstim y el Peg-filgrastim, cuando el GCSF está presente en una proteína de fusión Fc de cadena única de la presente divulgación. En concreto, la vida media del GCSF-sFc es casi una vez y media mayor que la del GCSF pegilado (Peg-filgrastim) y más de 4 veces mayor que la del GCSF recombinante (Lenograstim).

35 **Ejemplo 21**

Ensayo de actividad biológica de GCSF-sFc

40 Se usaron ratones neutropénicos para analizar la potencia de los GCSF en comparación con el GCSF nativo, es decir, Lenograstim (Granocyte®). En este estudio, 30 ratones machos BALB/cByJNarl de 6 semanas de edad se dividieron en seis grupos (es decir, cinco ratones por grupo). Todos los ratones fueron tratados con CPA (monohidrato de ciclofosfamida, por sus siglas en inglés; Sigma, No. Cat. C7397) (100 mg/kg) el día 0. El grupo A, como grupo de control, solamente recibió una solución de NaCl al 0,9 %/0,1 % de BSA el día 1. Tres grupos de referencia recibieron Lenograstim (Chugai, No. Cat. N3L212) en una única dosis (Grupos B1 y B2) o en cuatro dosis (Grupo B3) con una cantidad de 51,02, 116,07 y 12,75 µM/kg, respectivamente. Dos grupos de prueba recibieron una única dosis de GCSF-sFc con una cantidad de 51,02 µM/kg (Grupo C1) y 116,07 µM/kg (Grupo C2). Los grupos que recibieron una única dosis (Grupos A, B1, B2, C1 y C2) fueron inyectados el día 1 y el grupo que recibió 4 dosis (Grupo B3) fue inyectado los días 1, 2, 3 y 4. Todas las inyecciones se administraron mediante inyección subcutánea. Se recolectaron muestras de sangre cada día después de la administración y se analizaron con un hemocultivador (HEMAVET 950 LV) hasta la finalización del estudio. También se tomó una muestra de sangre 3 días antes del tratamiento con CPA (día -3) como referencia. El diseño experimental usado en este estudio se resume en la **Tabla 13**.

55 La **Figura 16** muestra que el pretratamiento de los ratones con CPA provocó neutropenia, es decir, una reducción del recuento de neutrófilos en la sangre de los ratones tratados (comparar los días -3 y 0 con el día 1 en todas las muestras). Sin embargo, se observó que la neutropenia era temporal y que el nivel de neutrófilos volvía lentamente a los niveles previos al tratamiento con CPA al cabo de aproximadamente 8 días en el grupo de control (ver los resultados del grupo A). Una dosis única de Lenograstim el día 1, con una dosis media de 51,02 µM/kg (Grupo B1) o una dosis alta de 116,07 µM/kg (Grupo B2), no tuvo ningún efecto apreciable en el aumento de los niveles de neutrófilos por encima de los observados en el grupo de control CPA durante el periodo de observación (comparar los Grupos B1 y B2 con el Grupo A). Las administraciones múltiples (4 dosis) de Lenograstim tras el tratamiento con CPA (Grupo B3) tuvieron cierto efecto en el aumento de los niveles de neutrófilos en comparación con los Grupos A, B1 y B2 (ver Grupo B3, días 3-5). Sin embargo, el efecto observado fue mínimo y de corta duración, ya que los niveles de neutrófilos apenas se elevaron por encima del rango normal y los niveles disminuyeron rápidamente a los niveles normales después del periodo de administración múltiple (ver Grupo B3, días 5 y siguientes).

En cambio, la administración de una administración única de una dosis media (51,02 $\mu\text{M/kg}$) o alta (116,07 $\mu\text{M/kg}$) de GCSF-sFc después del tratamiento con CPA elevó eficientemente los niveles de neutrófilos significativamente por encima del grupo de control y de todos los grupos tratados con Lenograstim (comparar los grupos C1 y C2 con los grupos A, B1, B2 y B3).

Así, la proteína de fusión Fc de cadena única de GCSF de la presente divulgación (GCSF-sFc) tiene una vida media más larga y es más potente y eficiente para potenciar la diferenciación y proliferación de neutrófilos en un modelo de enfermedad animal neutropénica en comparación con las formas nativa y pegilada de GCSF.

Ejemplo 22

Proteína de fusión Fc de cadena única de interferón beta (IFN β -sFc)

1. Proteína de fusión

En este ejemplo, se preparó una proteína de fusión que tenía una estructura de Fórmula 1 discutida anteriormente:

(B)-(Bisagra)-(C_{H2}-C_{H3}) en donde:

la molécula bioactiva (B) es la proteína interferón beta (IFN β) (SEQ ID NO: **73**);

la región bisagra (Bisagra) es una bisagra de IgG1 mutada (SEQ ID NO: **23**); y

(C_{H2}-C_{H3}) es un C_{H2}-C_{H3} de IgG1 (SEQ ID NO: **63**).

La secuencia de aminoácidos de longitud completa del IFN β -sFc se muestra en el Listado de Secuencias como la SEQ ID NO: **74**.

2. Vector de expresión

El IFN β -sFc se produjo usando un vector de expresión de ADN. El fragmento de ADN del IFN β -sFc se ensambló usando cebadores superpuestos por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ensamblaje. El fragmento IFN β -sFc ensamblado se ligó posteriormente a los sitios Pac I y Eco RV del vector pZD (pcDNA3.1Neo, Invitrogen, Carlsbad, CA, No. Cat. V790-20 con gen dhfr) para obtener pZD/IFN β -sFc como se muestra en la **Figura 17** y posteriormente se transformó en *E. coli*. La construcción del vector de expresión contenía el gen de resistencia a la zeocina como marcador de selección.

Ejemplo 23

Establecimiento de líneas celulares recombinantes estables productoras de IFN β -sFc

Las células CHO_{dhfr} se tripsinizaron y resuspendieron a una concentración de 3×10^6 células/mL en amortiguador CP-T (Cyto pluse, No. Cat. CP-T). Se transfectaron 0,2 mL de suspensión celular (6×10^5 células) con 10 μg del plásmido pZD-IFN β -sFc por electroporación (electroporador PA4000 PulseAgile®, Cyto Pulse Sciences). Después de 48 h de crecimiento en medio no selectivo, las transfectantes se incubaron en medio completo selectivo que contenía IMDM, 10 % de suero fetal bovino, zeocina (Invitrogen, No. Cat. 1486406) y 5 nM de MTX (Sigma, No. Cat. BCL5707V) para obtener un clon de alto rendimiento zG3-17-41. La expresión de la proteína de fusión secretada en el medio de cultivo se detectó y cuantificó por Q-ELISA.

Las células Z-BsFc originales se cultivaron en una placa de 10 cm con IMDM suplementado con 10 % de FBS, zeocina y 0,1 μM de MTX. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C humidificada 95 % de aire/5 % de CO₂ (Modelo 3326, Forma Scientific). Para adaptar las células a un medio de cultivo sin suero, se cambió el medio de IMDM a un medio JRH sin suero suplementado con 5 % de FBS, zeocina y 0,1 μM de MTX. Cuando las células se estabilizaron, se separaron de la placa de 10 cm por tripsinización y posteriormente se transfirieron a matraces oscilatorios que contenían 50 mL de medio JRH sin suero suplementado con el mismo porcentaje de FBS. Cuando la confluencia alcanzó 90 % en 3-5 días, las células se subcultivaron en matraces oscilatorios que contenían medio JRH libre de suero suplementado con un porcentaje menor de FBS. Las células se adaptaron a condiciones de suero más bajo disminuyendo gradualmente el porcentaje de FBS de 10 % a 0 % en matraces oscilatorios.

La concentración de la proteína de fusión IFN β -sFc en las muestras de suero se cuantificó por un kit ELISA interno para IFN β -sFc. Antes de realizar ensayos formales con la proteína de fusión, se optimizó la dilución del suero y se determinó la disposición de las placas para los estándares, los controles y las muestras. La absorbancia a longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirió por el software SoftMax® Pro 5. Se obtuvieron con éxito clones de alto rendimiento por selección, dilución limitante y desafíos escalonados de MTX para producir finalmente la

proteína de fusión que comprende el IFN β recombinante enlazado a Fc de cadena única (es decir, IFN β -sFc). La proteína de fusión resultante se purificó para posteriores ensayos de actividad biológica y estudios farmacocinéticos *in vitro* o *in vivo*.

5 **Ejemplo 24**

Purificación cromatográfica de IFN β -sFc

10 Se usó resina basada en proteína A (MabSelect SuRe™) para purificar IFN β -sFc. Después de la purificación, se analizó la tasa de recuperación correspondiente por ELISA cuantitativa, y la pureza respectiva por SDS-PAGE. A continuación se describe detalladamente el proceso de purificación del IFN β -sFc.

Purificación por MabSelect SuRe™

15 El medio de cultivo de la línea celular productora de IFN β -sFc de alto rendimiento se aplicó a una columna Protein A basada en MabSelect SuRe™ (GE; No. Cat. 11-0034-93) con una relación de carga de aproximadamente 1,58 mg para 1 mL de resina. Después de 2 pasos de lavado, la proteína de fusión se eluyó con el amortiguador de elución con 0,1 M de glicina a pH 3,0. Se analizó la proteína que eluyó en el pico principal de la columna MabSelect SuRe™ y se comprobó que era relativamente pura, basado en el pico agudo observado por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) y la banda aguda obtenida por SDS-PAGE (datos no mostrados). El eluido de MabSelect SuRe™ también se analizó por Q-ELISA para determinar la cantidad y la tasa de recuperación, como se muestra en la **Tabla 14**.

25 **Ejemplo 25**

Estudio farmacocinético de IFN β -sFc

30 Se adquirieron ocho ratas Lewis, con un peso de 200-230 g, a BioLASCO Taiwan Co., Ltd., que las sometió a cuarentena y las aclimató por cuatro días antes de iniciar los estudios farmacocinéticos (PK). Todas las ratas fueron puestas en cuarentena y aclimatadas por cuatro días antes del inicio de los estudios farmacocinéticos (PK). Las ratas se dividieron en dos grupos de prueba para los estudios de PK: (1) IFN β -1a humano natural derivado de fibroblastos (Rebif®) y (2) IFN β -sFc. Rebif® e IFN β -sFc se administraron a las ratas a una dosis de 37 μ g/kg. Todos los artículos se prepararon en fresco con diluyentes de muestra frescos, albúmina bovina en suero al 0,2 % (AppliChem, No. Cat. A0850,0250) en solución salina amortiguada con fosfato. Las ratas se agruparon y se etiquetaron con tinte para pieles. Todas las inyecciones se administraron a las ratas mediante la zona dorsal del cuello por vía subcutánea (S.C.).

35 Se recolectaron muestras de sangre a los 5 min, 0,5, 1, 4, 7, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas después de la inyección, respectivamente, y posteriormente se centrifugaron a 3.000 rpm por 20 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C.

40 Las concentraciones de interferón en muestras de suero se cuantificaron por VeriKine™ Human IFN Beta ELISA Kit (PBL assay science, No. Cat. 41410) para IFN β . Las absorbancias a las longitudes de onda de 450 nm y 600 nm se adquirieron con el software SoftMax® Pro 5. Los valores de $C_{\max}$, $T_{\max}$, ABC y la vida media en la fase de eliminación ($T_{1/2}$) a partir de las concentraciones de interferón en suero se calcularon por el software PK Solutions 2.0™.

45 Los perfiles farmacocinéticos subcutáneos (S.C.) de IFN β en ratas después de la administración con una dosis única se muestran en la **Figura 18** y los atributos farmacocinéticos medios se recolectan en la **Tabla 15**. La vida media de Rebif® e IFN β -sFc fue de 18,92-23,57 y 31,89-37,7 horas, respectivamente. La $C_{\max}$ de Rebif® e IFN β -sFc fue de $3,2 \pm 0,71$ y $6,55 \pm 0,78$ ng/mL, respectivamente. El $T_{\max}$ de Rebif® e IFN β -sFc fue de 12 ± 0 y $9,55 \pm 3,61$ horas, respectivamente. El ABC de Rebif® e IFN β -sFc fue de $115 \pm 18,38$ y $273 \pm 2,83$ ng·h/mL, respectivamente.

55 La IFN β -sFc de la presente invención mostró una mejora en la extensión de la vida media, como se muestra en la **Figura 18** y en la **Tabla 15**, en comparación con la de Rebif® (la forma nativa de IFN β).

Ejemplo 26

60 Ensayo de actividad biológica de IFN β -sFc

El IFN β es una citocina antiinflamatoria y constituye uno de los principales fármacos para el tratamiento de la esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés). La MS es la enfermedad inflamatoria más común del sistema nervioso central. Las células inmunitarias atraviesan la barrera hematoencefálica y atacan la mielina, lo que provoca una conducción ineficaz de las señales en el sistema nervioso de los pacientes con MS. Las inyecciones de fármaco IFN β varias veces por semana son necesarias para controlar la recaída de la MS. Se ha informado de

que el mecanismo antiinflamatorio del IFN β en la MS involucra un desplazamiento del equilibrio de citocinas de Th1 a Th2 en la respuesta de las células T contra los elementos de la vaina de mielina. Además de los grupos Th1 y Th2, se ha descubierto que otras dos citocinas proinflamatorias importantes, incluida la osteopontina (OPN), desempeñan papeles importantes en la inflamación del CNS (por sus siglas en inglés) en la patogénesis de la MS. Se ha demostrado que el IFN β inhibe la producción de OPN en células T primarias derivadas de PBMC (por sus siglas en inglés) y que la inhibición se produce a nivel de las células T CD4⁺.

En este estudio, se evaluó la actividad biológica de IFN β -sFc en un ensayo de inhibición de la osteopontina y se comparó su actividad con la del IFN β -1a natural (Rebif®). Brevemente, el ensayo de inhibición de la osteopontina se llevó a cabo de la siguiente manera: Se aislaron PBMC humanas de sangre total. Para la estimulación de PBMC, se recubrió previamente una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pozos con 100 μ L de anticuerpo anti-CD3 a una concentración de 1 μ g/mL por pozo y se incubó durante la noche a 4 °C. Cada pozo se lavó con 200 μ L de RPMI 1640 (con FBS) y se sembró con 5 $\times$ 10⁴ células. Los pozos individuales se trataron con 1 μ g/mL de anticuerpo anti-CD28, IFN β -sFc (1,5 o 10 ng/mL) o Rebif® (1,5 o 10 ng/mL), y las placas se incubaron por 48 horas a 37 °C en un incubador humidificado con 5 % de CO₂. Después de la incubación, se cosechó el sobrenadante de cada pozo y se guardó en el congelador a -70 °C. La cantidad de osteopontina humana (OPN) se midió por ELISA (R&D systems, No. Cat. DOST00).

La concentración de OPN en cada muestra se calculó del siguiente modo: Se trazaron curvas estándar separadas con OPN en el eje X y absorbancia (OD₄₅₀-OD₅₇₀) en el eje Y y se dibujó una línea de ajuste usando una ecuación logística de 4 parámetros. Posteriormente se calcularon las concentraciones de OPN usando la siguiente ecuación: $X = X_0 \times \{[a/(Y - Y_0) - 1]^{(1/b)}\}$, como se describe en Chen M., *et al.* "Regulatory effects of IFN- β on production of osteopontin and IL-17 by CD4⁺ T Cells in MS" *Eur. J. Immunol.* 39, 2525-2536 (2009).

Como se muestra en la **Figura 19**, la proteína de fusión Fc de cadena única de la presente divulgación (IFN β -sFc) inhibió significativamente la producción de OPN en células tratadas con 1,5 ng/mL (73,4 $\pm$ 0,8 %) y 10 ng/mL (79,5 $\pm$ 3,6 %) del artículo de prueba. Las células tratadas con el artículo de referencia (Rebif®) demostraron una inhibición similar de OPN a 1,5 ng/mL (88,4 $\pm$ 2,7 %) y 10 ng/mL (81,3 $\pm$ 13,3 %). Estos resultados sugieren que la inclusión de una cadena única Fc no interfiere significativamente con la capacidad de la porción IFN β de la proteína de fusión para unirse eficientemente a su receptor, ya que IFN β -sFc tiene una actividad biológica comparable a la del IFN β nativo.

Tabla 1

Ejemplos de regiones bisagra mutadas		
Tipo de IgG	Secuencia	SEQ ID NO
IgG1 de tipo silvestre	EPKSCDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 1
IgG1 mutada	EPKSXDKTHTXPPXP	SEQ ID NO: 2
	EPKSXDKTHTXPP	SEQ ID NO: 3
	EPKSXDKTHT	SEQ ID NO: 4
	DKTHTXPPXP	SEQ ID NO: 5
IgG2 de tipo silvestre	ERKCCVECP	SEQ ID NO: 6
IgG2 mutada	ERKXXVEXPPXP	SEQ ID NO: 7
	ERKXXVEXPP	SEQ ID NO: 8
	VEXPPXP	SEQ ID NO: 9
IgG3 de tipo silvestre	ELKTPLGDTTHTCPRCP	SEQ ID NO: 10
IgG3 mutada	ELKTPLGDTTHTXPRXP	SEQ ID NO: 11
	ELKTPLGDTTHTXPR	SEQ ID NO: 12
	ELKTPLGDTTHT	SEQ ID NO: 13
IgG3 de tipo silvestre	EPKSCDTPPPCPRCP	SEQ ID NO: 14
IgG3 mutada	EPKSXDTPPPXPXP	SEQ ID NO: 15
	EPKSXDTPPPXP	SEQ ID NO: 16
	EPKSXDTPPP	SEQ ID NO: 17
	DTPPPXPXP	SEQ ID NO: 18
IgG4 de tipo silvestre	ESKYGPPCPSCP	SEQ ID NO: 19
IgG4 mutada	EXKYGPPCPXCP	SEQ ID NO: 20
	EXKYGPPCP	SEQ ID NO: 21
	KYGPPCPXCP	SEQ ID NO: 22
X: Ser, Gly, Thr, Ala, Val, Leu, Ile, Met, y/o delección		

Tabla 2

Ejemplos de secuencias de aminoácidos de regiones bisagra mutadas derivadas de IgG1	
Secuencias de aminoácidos ¹	SEQ ID NO
EPKSSDKTHTSPSP	SEQ ID NO: 23
EPKSSDKTHTSPP	SEQ ID NO: 24

Ejemplos de secuencias de aminoácidos de regiones bisagra mutadas derivadas de IgG1	
Secuencias de aminoácidos¹	SEQ ID NO
EPKSSDKTHTSPPP	SEQ ID NO: 25
EPKSSDKTHT	SEQ ID NO: 26
DKTHTSPPSP	SEQ ID NO: 27
DKTHTSPP	SEQ ID NO: 28
EPKSDKTHTPPP	SEQ ID NO: 29
EPKSDKTHTSPPSP	SEQ ID NO: 30
EPKSGDKTHTGPPGP	SEQ ID NO: 31
EPKSGDKTHTGPP	SEQ ID NO: 32
EPKSGDKTHTGPPP	SEQ ID NO: 33
EPKSGDKTHT	SEQ ID NO: 34
DKTHTGPPGP	SEQ ID NO: 35
DKTHTGPP	SEQ ID NO: 36
EPKSDKTHTGPPGP	SEQ ID NO: 37
EPKSGDKTHTSPPSP	SEQ ID NO: 38
EPKSGDKTHTGPPSP	SEQ ID NO: 39
EPKSSDKTHTGPPGP	SEQ ID NO: 40
EPKSSDKTHTGPPSP	SEQ ID NO: 41
EPKSSDKTHTGPP	SEQ ID NO: 42
EPKSGDKTHTSPP	SEQ ID NO: 43
EPKSTDKTHTTPPTP	SEQ ID NO: 44
EPKSTDKTHTTPP	SEQ ID NO: 45
EPKSTDKTHTTPPP	SEQ ID NO: 46
EPKSTDKTHT	SEQ ID NO: 47
DKTHTTPPTP	SEQ ID NO: 48
DKTHTTPP	SEQ ID NO: 49
EPKSDKTHTTPPTP	SEQ ID NO: 50
EPKSSDKTHTTPPTP	SEQ ID NO: 51
EPKSSDKTHTSPPTP	SEQ ID NO: 52
EPKSADKTHTLPPMP	SEQ ID NO: 53
EPKSVDKTHTLPPIP	SEQ ID NO: 54
EPKSLDKTHTAPPAP	SEQ ID NO: 55
EPKSVDKTHTAPP	SEQ ID NO: 56
EPKSMDKTHTVPP	SEQ ID NO: 57
EPKSIDKTHTLPP	SEQ ID NO: 58
DKTHTAPPLP	SEQ ID NO: 59
DKTHTVPPLP	SEQ ID NO: 60

¹ Los residuos subrayados representan los lugares de mutación en relación con la secuencia de la IgG de tipo silvestre.

Tabla 3

Purificación de EPO-sFc por una resina de proteína A (MabSelect SuRe™) y columnas de cromatografía de resina DEAE (DEAE FF)					
Resina	Muestra	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)	Cantidad (mg)	Tasa de recuperación (%)
MabSelect SuRe™	Carga media	0,096	50	4,8	65,8
	Eluido a pH 3,0	0,355	8,8	3,124	
DEAE FF	EPO-sFc	0,296	20	5,92	15,48
	Eluido con NaCl	0,067	14	0,938	

Tabla 4

Purificación de FIX-sFc por una resina de proteína A (MabSelect SuRe™) y columnas de cromatografía de resina IX Select					
Resina	Muestra	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)	Cantidad (mg)	Tasa de recuperación (%)
MabSelect SuRe™	Carga media	0,0188	98	1,8424	88,34
	Eluido a pH	0,217	7,5	1,6275	

	3,0				
IX Select	FIX-sFc	0,0188	90	1,692	20,05
	Eluido con NaCl	0,0261	13	0,3393	

Tabla 5

Atributos farmacocinéticos de EPO recombinante (EPREX®) y de EPO-sFc purificada a partir de DEAE FF		
	EPO recombinante (EPREX®)	EPO-sFc
Vida media (h)	6,182 ± 0,675	22,3 ± 0,38*
C _{máx} (ng/mL)	6,47 ± 1,07	7,2 ± 0,71
T _{máx} (h)	9,33 ± 2,31	18 ± 0,00
ABC (0-t)	161,5 ± 23,64	327,4 ± 15,13

Los valores representan medias ± D.S. (CV)* en comparación con EPREX®, P < 0,05.

Tabla 6

Atributos farmacocinéticos de FIX recombinante (BeneFIX®) y FIX-sFc purificado a partir de MabSelect SuRe™		
	FIX recombinante (BeneFIX®)	FIX-sFc
Vida media (h)	11,91 ± 2,54	56,0 ± 13,1
C inicial (ng/mL)	11790,98 ± 4898,85	4668,0 ± 447,5
ABC (ng·h/mL)	46594,40 ± 3634,08	19080,3 ± 2606,4

Los valores representan medias ± D.S. (I.V)

5

Tabla 7

Comparación de la potencia entre EPO recombinante (EPREX®) y EPO-sFc		
	EPO recombinante (EPREX®)	EPO-sFc
ABEC ₀₋₁₃ (ng·h/mL)	88,69	91,03
RET _{máx}	11,12 %	10,48 %

Tabla 8

Comparación de potencia entre FIX recombinante (BeneFIX®) y FIX-sFc							
Dosis	Prueba APTT (s)						
	FIX recombinante (BeneFIX®)			FIX-sFc			
	No. 1	No. 2	Promedio	No. 1	No. 2	No. 3	Promedio
10,0 µg/mL	25,0	25,6	25,3	23,5	26,6	26,3	25,5
5,0 µg/mL	28,1	27,0	27,6	23,5	27,6	27,6	26,2
2,5 µg/mL	30,4	29,2	29,8	30,1	29,9	30,2	30,1
Actividad específica (UI/mg)	200			218			
Potencia relativa ¹	1			1,09			

¹ La potencia relativa es la relación entre la actividad específica de la muestra de prueba y la actividad específica del FIX recombinante (es decir, 200 UI/mg).

10

Tabla 9

Atributos farmacocinéticos de los interferones en ratas después de su administración subcutánea					
	Pegasys® (IFNα pegilado)	IFNα-sFc	PEG-Intron® (IFNα pegilado)	Roferon-A® (IFNα recombinante)	
Vida media (h)	23,2	50,2	20,8	0,73	
C _{máx} (pM)	820,6	677,6	182,1	213,0	
T _{máx} (h)	320	32,0	6,0	0,67	
ABC (pM/h)	64694,5	60621,9	5307,6	489,2	
Eliminación (mL/h/kg)	160,8	390,7	1759,1	682,0	
Vd/kg (mL/kg)	4,8	5,4	58,6	638,2	

Tabla 10

Actividad antiviral de los interferones en ratas después de su administración subcutánea			
	IFNα-sFc ² (monómero)	IFNα-Fc ³ (dímero)	Pegasys® (IFNα pegilado)
IC ₅₀ (nM)	0,0061	0,0313	0,0894
Relación ¹	1	0,20	0,07

¹ La relación es una comparación de la IC₅₀ de la muestra respectiva con la IC₅₀ de IFNα-sFc. ² El término

"monómero" refleja un fragmento de sFc incapaz de formar un dímero unido por un puente disulfuro. ³ El término "monómero" refleja un fragmento de sFc capaz de formar un dímero unido por un puente disulfuro.

Tabla 11

Atributos de afinidad de unión de IFN α -sFc (fragmento sFc incapaz de formar un dímero unido por un puente disulfuro) e IFN α -Fc (fragmento sFc capaz de formar un dímero unido por un puente disulfuro) a IFNAR1			
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
IFN α -sFc (monómero)	1,4E+06	5,6E-03	4,0E-09
IFN α -Fc (dímero)	3,3E+06	5,6E-02	1,8E-08

Tabla 12

Atributos farmacocinéticos de los GCSF en ratas después de su administración subcutánea			
	GCSF-sFc	Granocyte® (Lenograstim)	Neulasta® (Peg-filgrastim)
T _{máx} (h)	48	0,5	10,3
C _{máx} (ng/mL)	906,9	156,4	480,8
Vida media (h)	17,16	4,1	12,0
ABC (ng·h/mL)	50624	790-1292	23202 ± 2921

5

Tabla 13

Preparación experimental para el ensayo de actividad biológica de GCSF-sFc				
Grupo ¹	Muestra	Tratamiento ²	# Dosis	Cantidad (µM/kg)
A	Control	0,9 % de NaCl/0,1 % de BSA	1	--
B1	Referencia	Lenograstim	1	51,02
B2	Referencia	Lenograstim	1	116,07
B2	Referencia	Lenograstim	4	12,75
C1	Prueba	GCSF-sFc	1	51,02
C2	Prueba	GCSF-sFc	1	116,07

¹ Cada Grupo contenía 5 ratones neutropénicos. ² Todos los Grupos fueron pretratados con CPA (monohidrato de ciclofosfamida) el Día 0. La administración del fármaco de tratamiento se realizó el Día 1 para los Grupos que recibieron una única dosis, y los Días 1, 2, 3 y 4 para el Grupo que recibió 4 dosis.

Tabla 14

Tasa de recuperación de IFN β -sFc purificado con resina de proteína A, determinada por ELISA				
	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)	Cantidad (mg)	Recuperación (%)
Carga media	0,01	925,0	8,33	--
Eluido	0,25	25,0	6,34	76,13

10

Tabla 15

Atributos farmacocinéticos del IFN β en ratas después de su administración subcutánea		
	Rebif® (IFN β natural)	IFN β -sFc
T _{1/2} (h)	18,92-23,57	31,89-37,70
T _{máx} (h)	12,0010	9,55 ± 3,61
C _{máx} (ng/mL)	3,20 ± 0,71	6,55 ± 0,78
ABC (ng·h/mL)	115 ± 18,38	273 ± 2,83
Eliminación (mL/h/kg)	326 ± 53,74	136 ± 1,41

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión producida en una célula de mamífero que comprende:
 - 5 a) una molécula bioactiva seleccionada del grupo que consiste en eritropoyetina, Factor IX, IFN α , GCSF e INF β ; y
 - b) un fragmento Fc de cadena única (sFc) de una molécula IgG que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61, 62, 63 y 64,
 - 10 c) una región bisagra entre la molécula bioactiva y el fragmento sFc, en donde la región bisagra está mutada y no forma puentes disulfuro con otra proteína de fusión u otra molécula de inmunoglobulina, y en donde la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23-60.
- 15 2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 o 27.
3. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la molécula bioactiva tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 65, 67, 69, 71, y 73.
- 20 4. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 66, 68, 70, 72, y 74.
5. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Un método para producir una proteína de fusión en una célula de mamífero que comprende:
 - a) proporcionar una molécula bioactiva y un fragmento sFc que comprenda una región bisagra, en donde la molécula bioactiva seleccionada del grupo que consiste en eritropoyetina, Factor IX, IFN α , GCSF e INF β ;
 - 30 b) mutar la región bisagra del fragmento sFc por sustitución y/o delección de aminoácidos para formar una región bisagra mutada de un fragmento sFc mutado, y
 - c) combinar la molécula bioactiva y el fragmento sFc mutado a través de la región bisagra mutada,
 - 35 en donde la región de bisagra mutada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23-60, y en donde la región bisagra mutada no forma puentes disulfuro con otra proteína de fusión u otra molécula de inmunoglobulina.
- 40 7. Una proteína de fusión producida en una célula de mamífero que comprende:
 - a) un fragmento Fc de cadena única (sFc) de una molécula IgG que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61, 62, 63 y 64;
 - 45 b) una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 23-60; y
 - c) una molécula bioactiva con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 65, 67, 69, 71, y 73.
 - 50
8. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la secuencia de aminoácidos de la región bisagra es la SEQ ID NO: 23 o 27.



Figura 1A

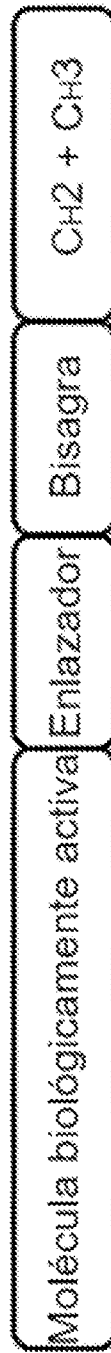


Figura 1B



Figura 1C

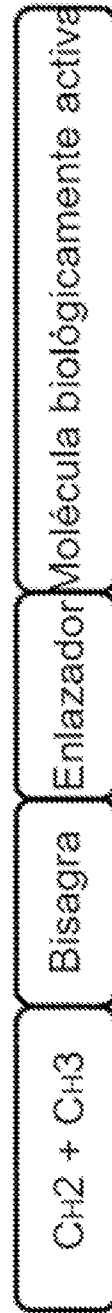


Figura 1D

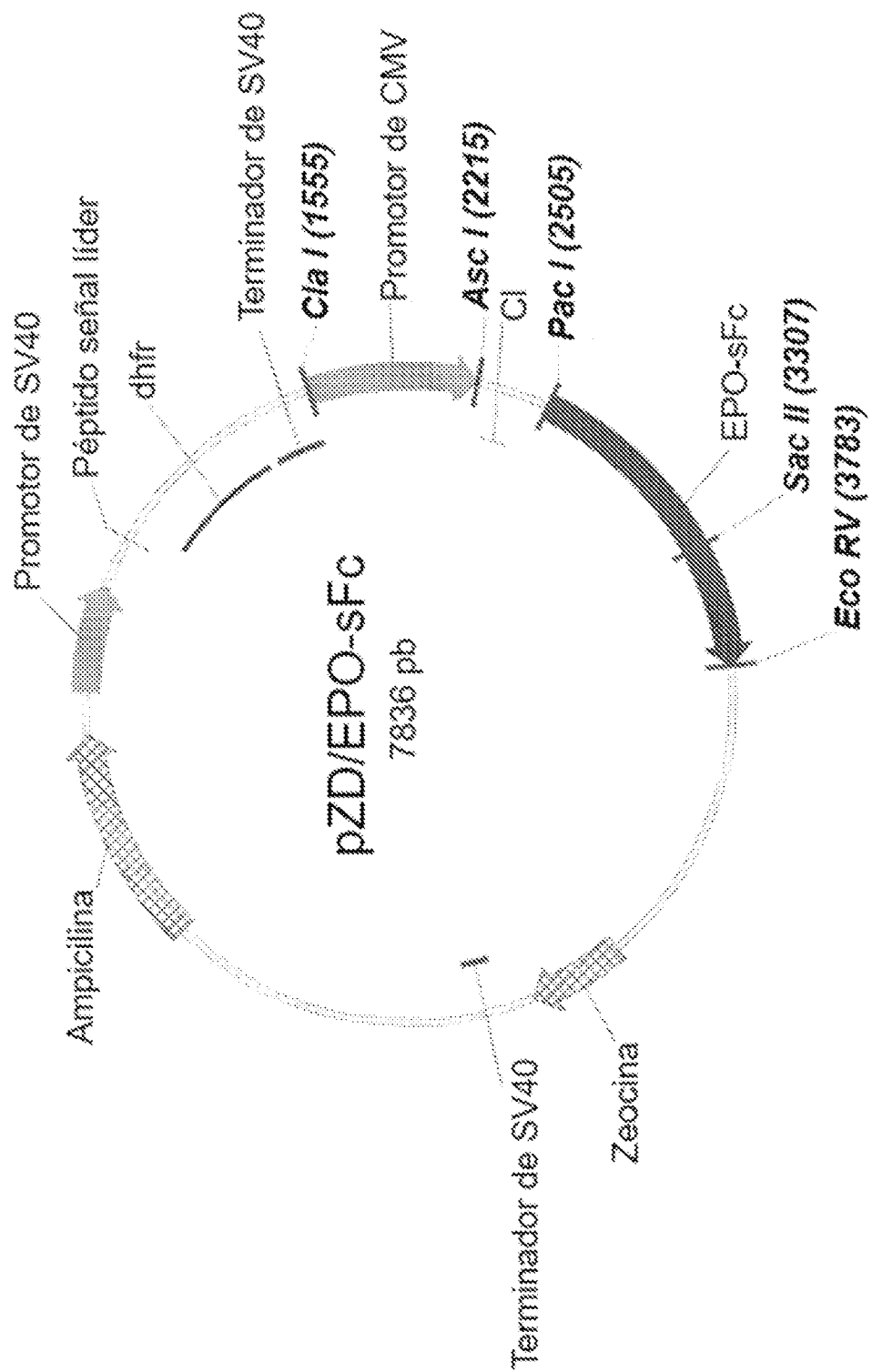


Figura 2

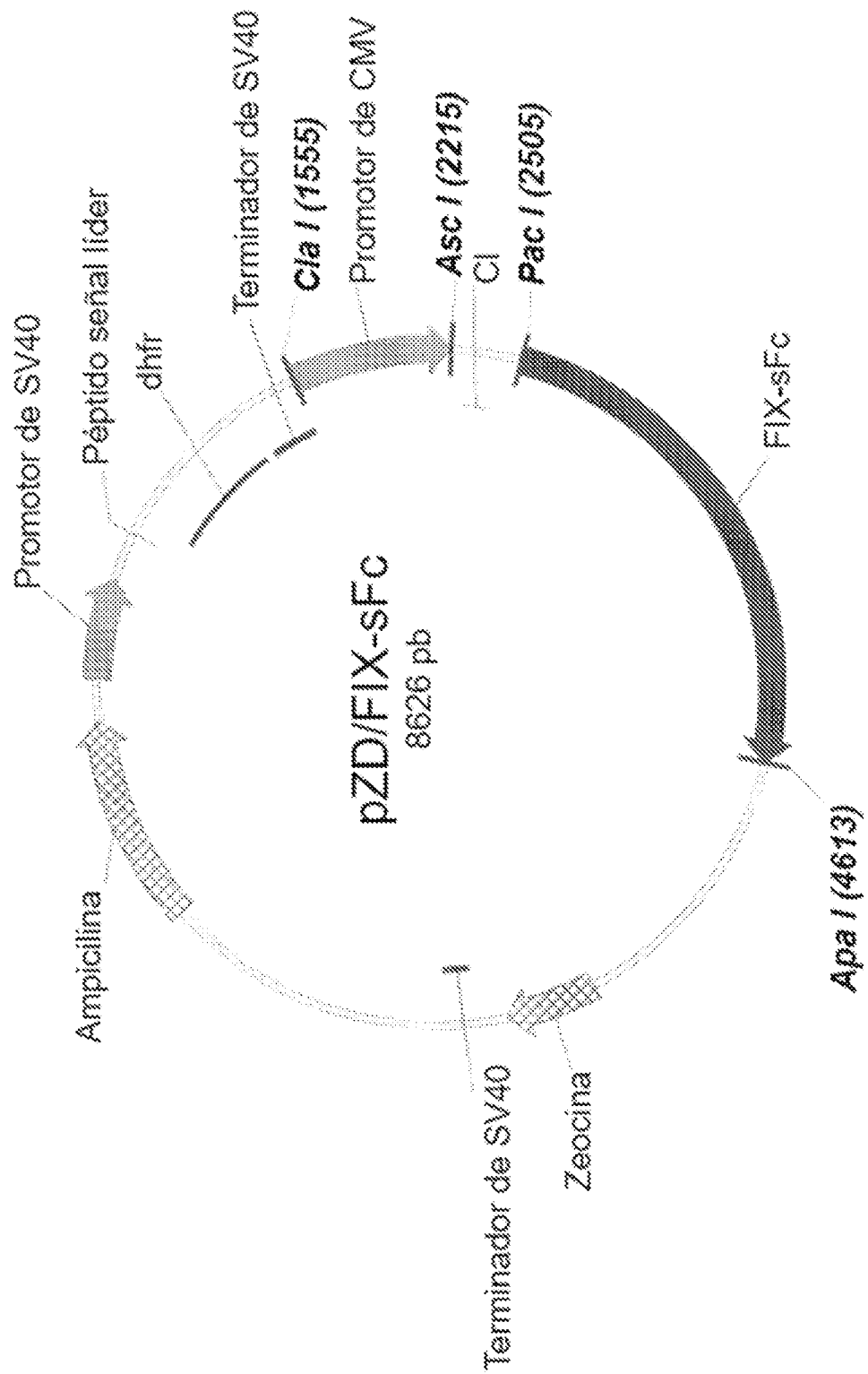


Figura 3

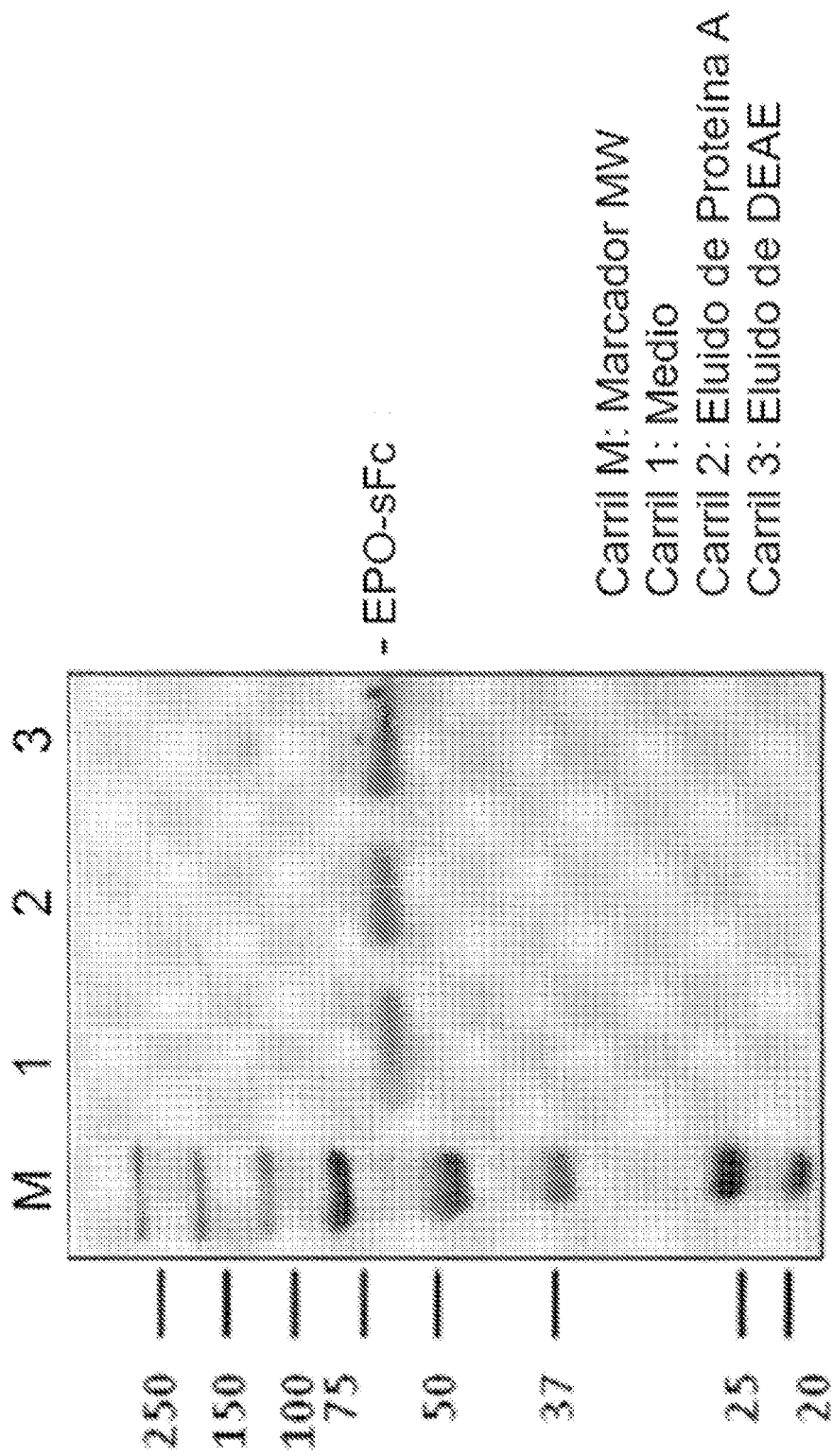


Figura 4

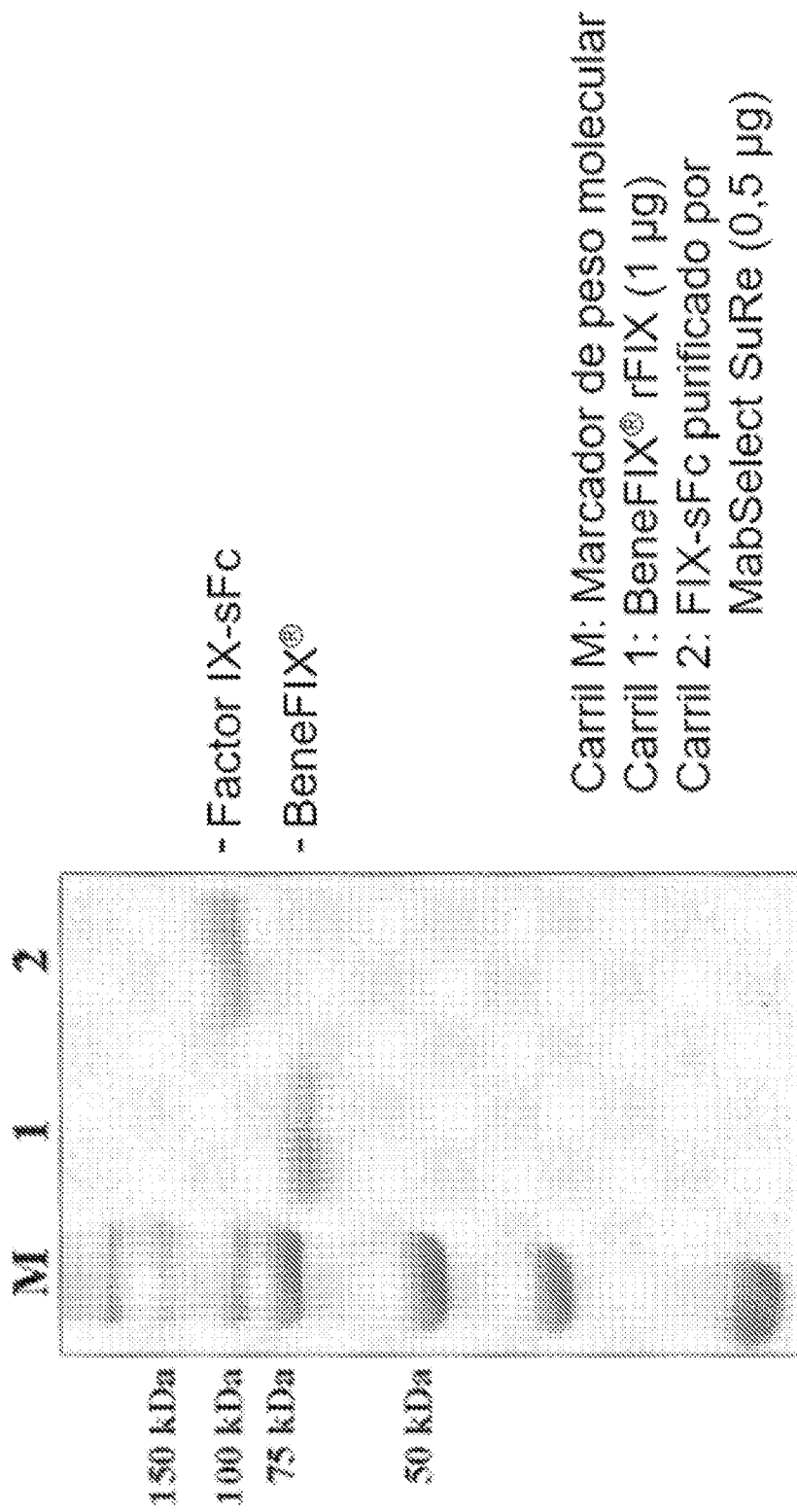


Figura 5

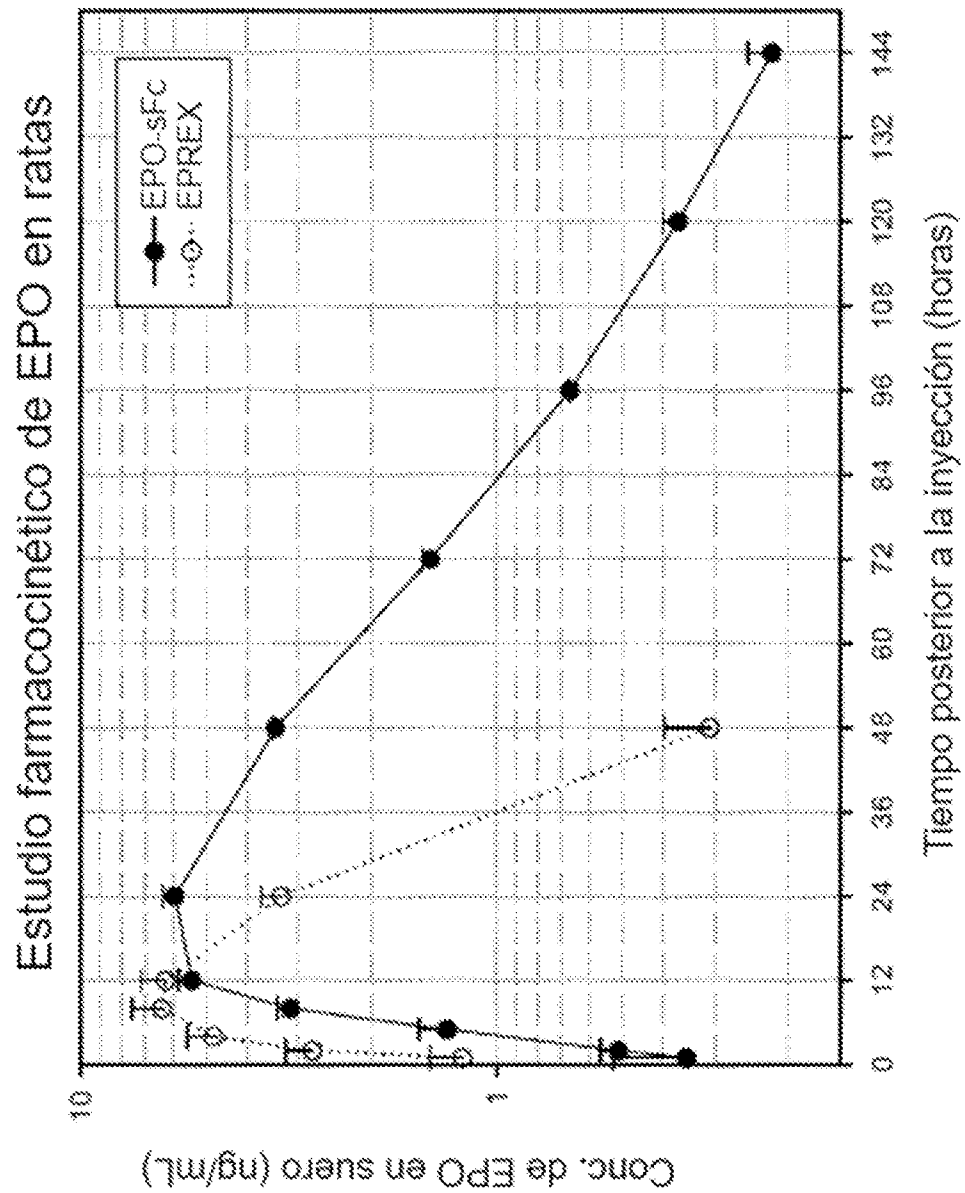


Figura 6

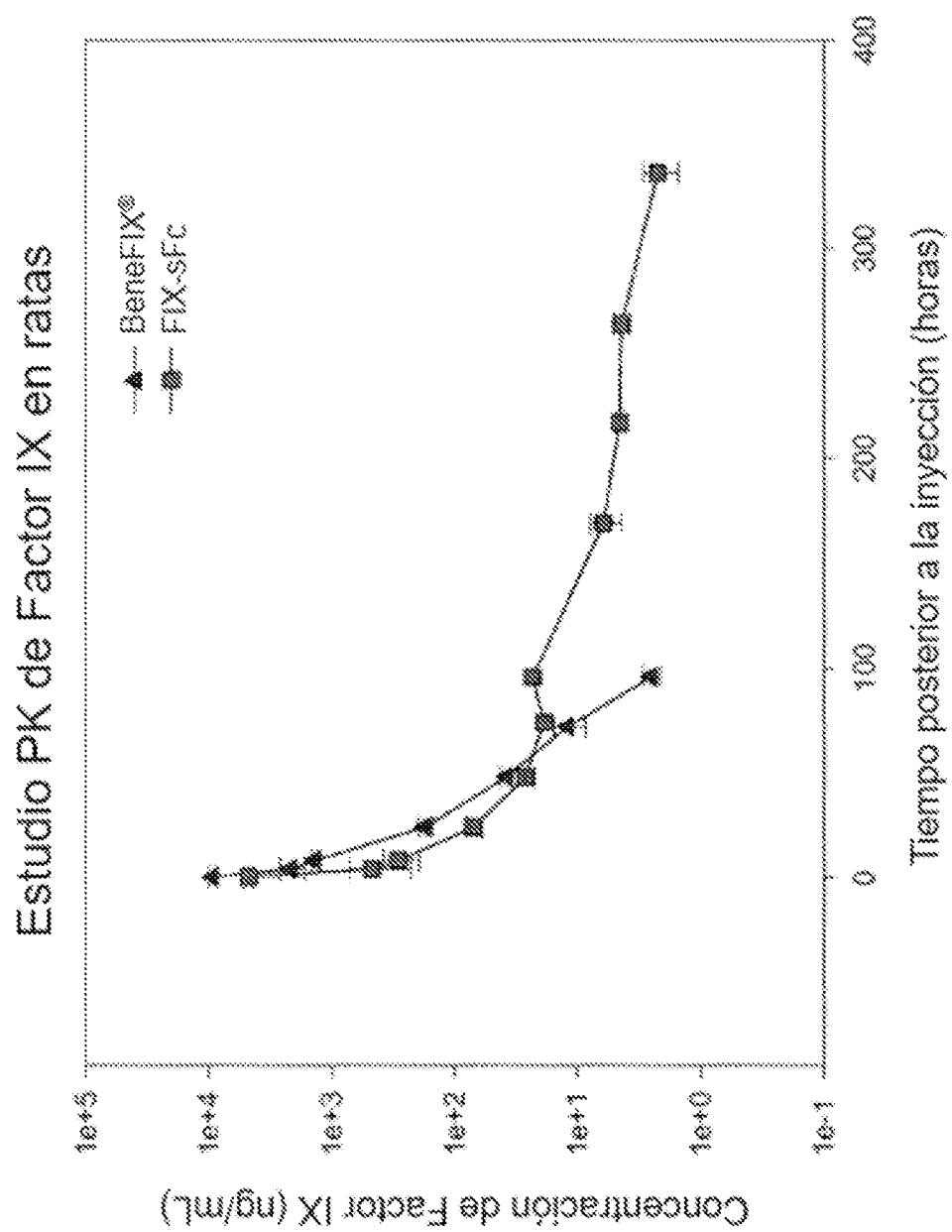


Figura 7

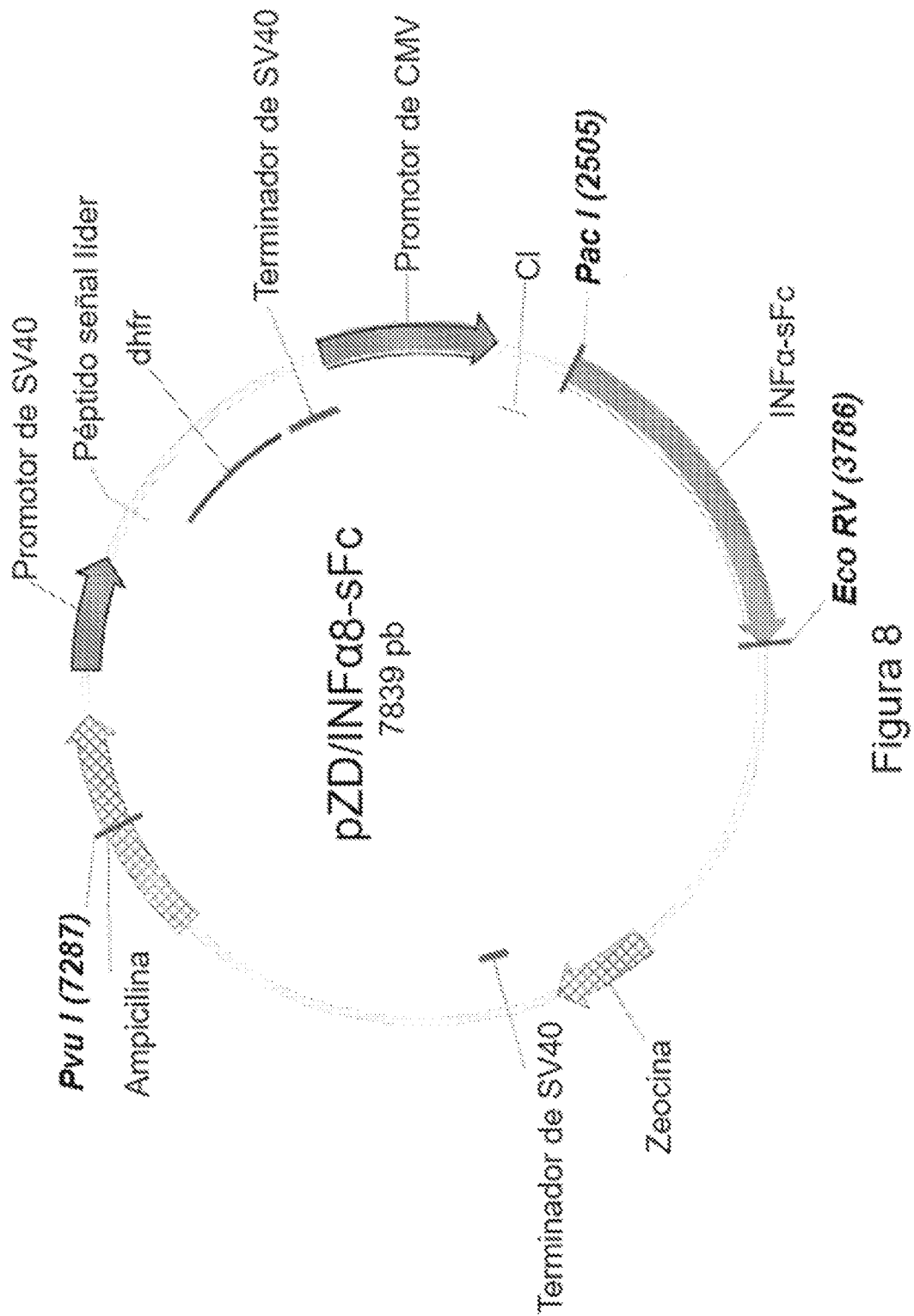


Figura 8

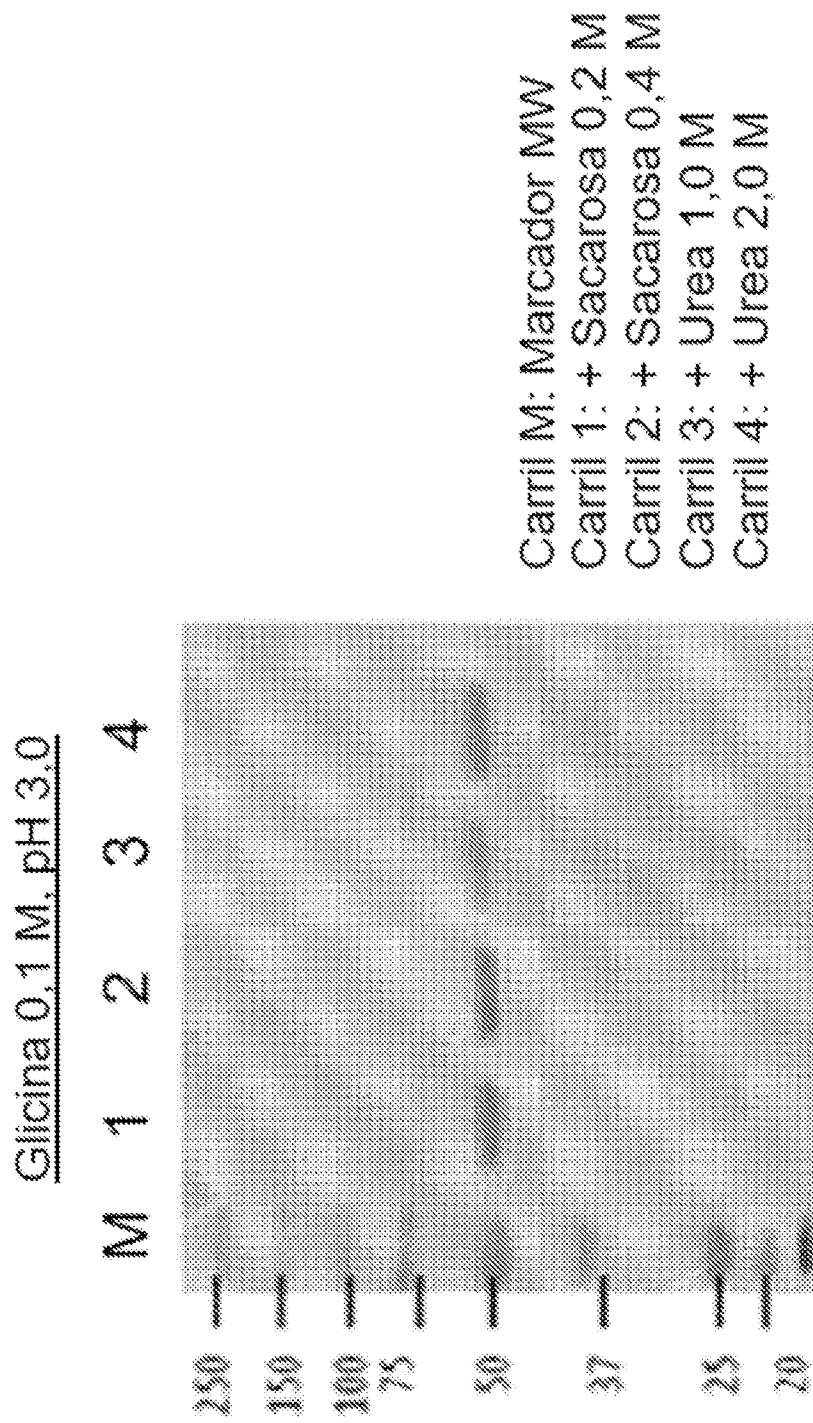


Figura 9

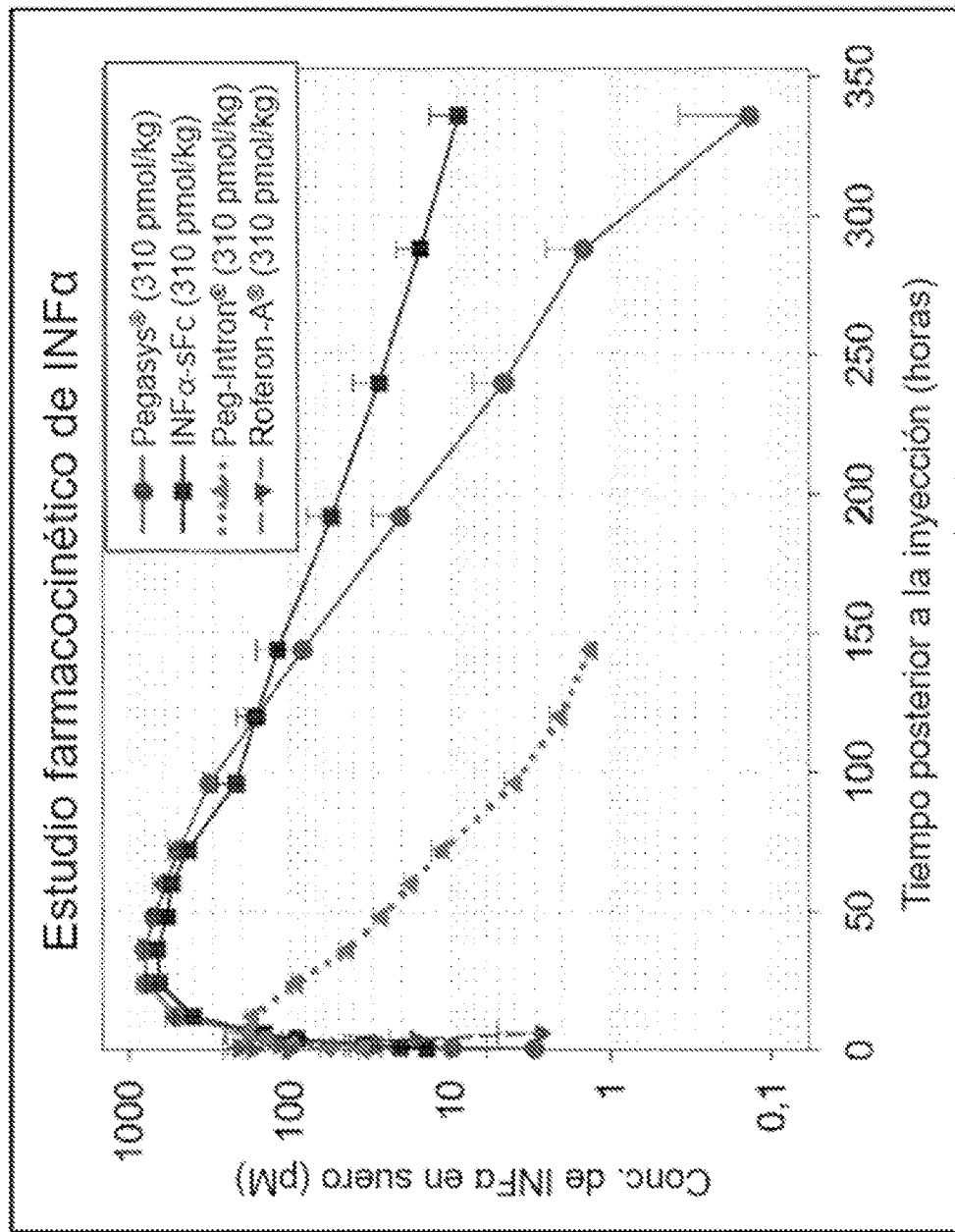


Figura 10

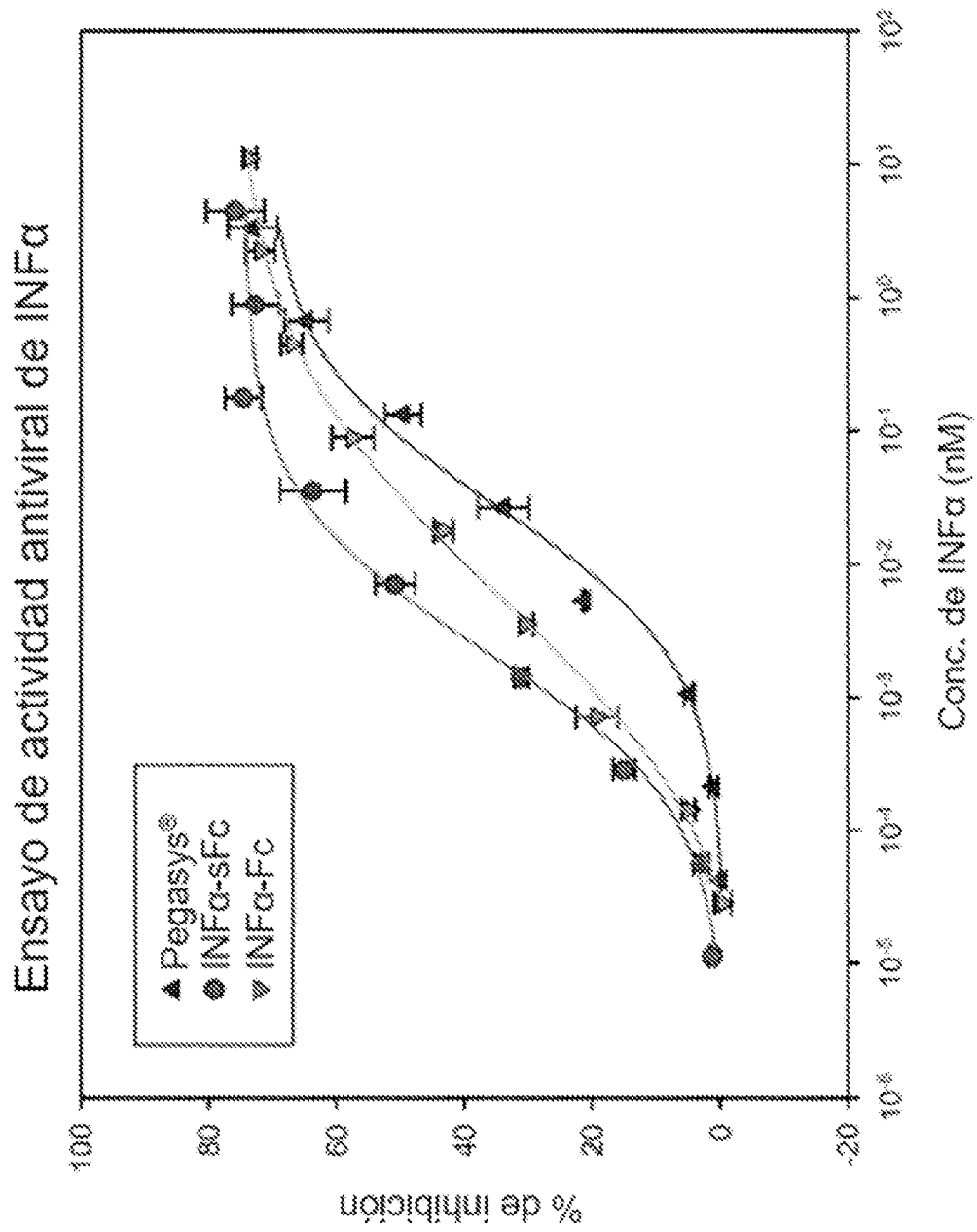


Figura 11

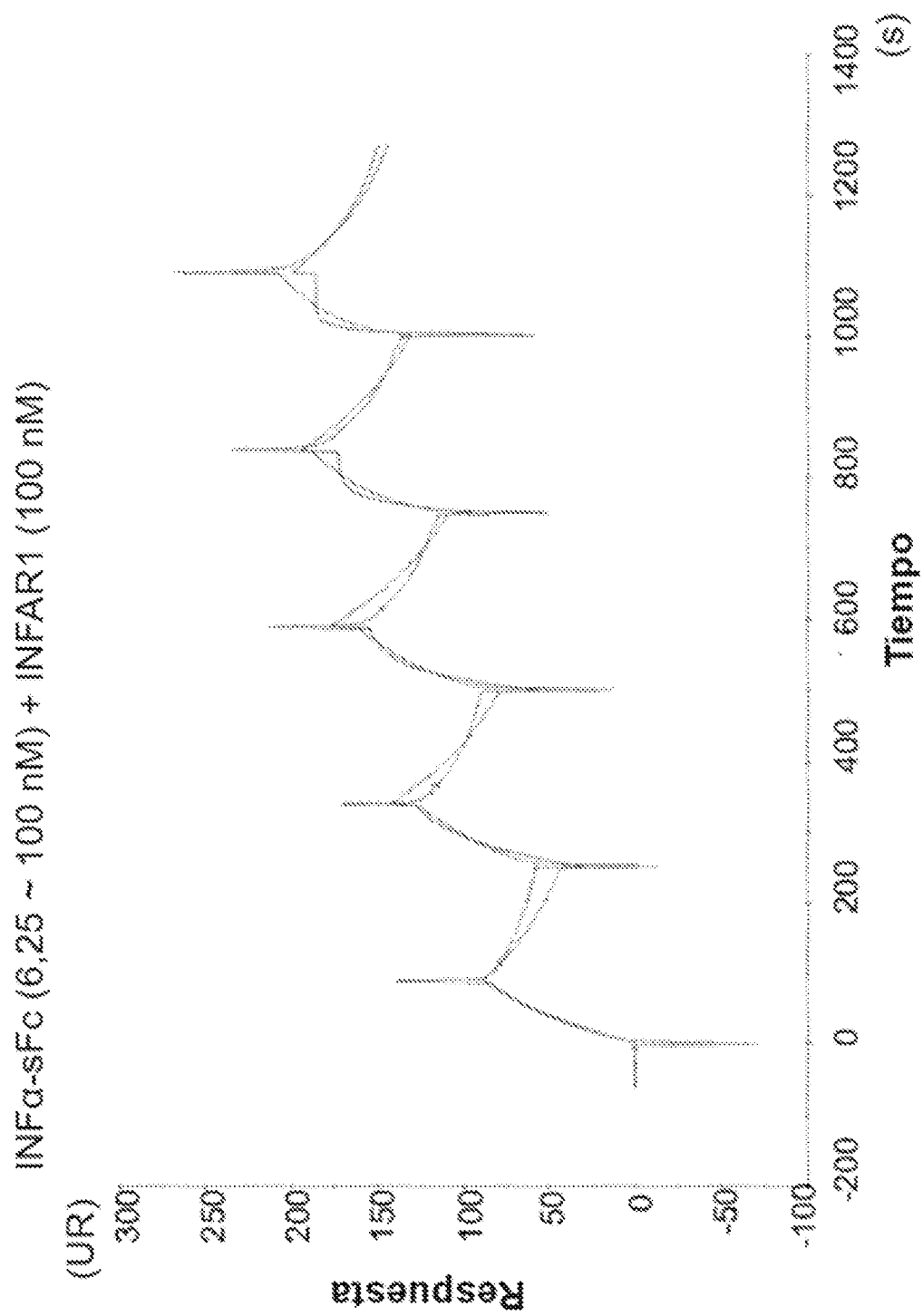


Figura 12A

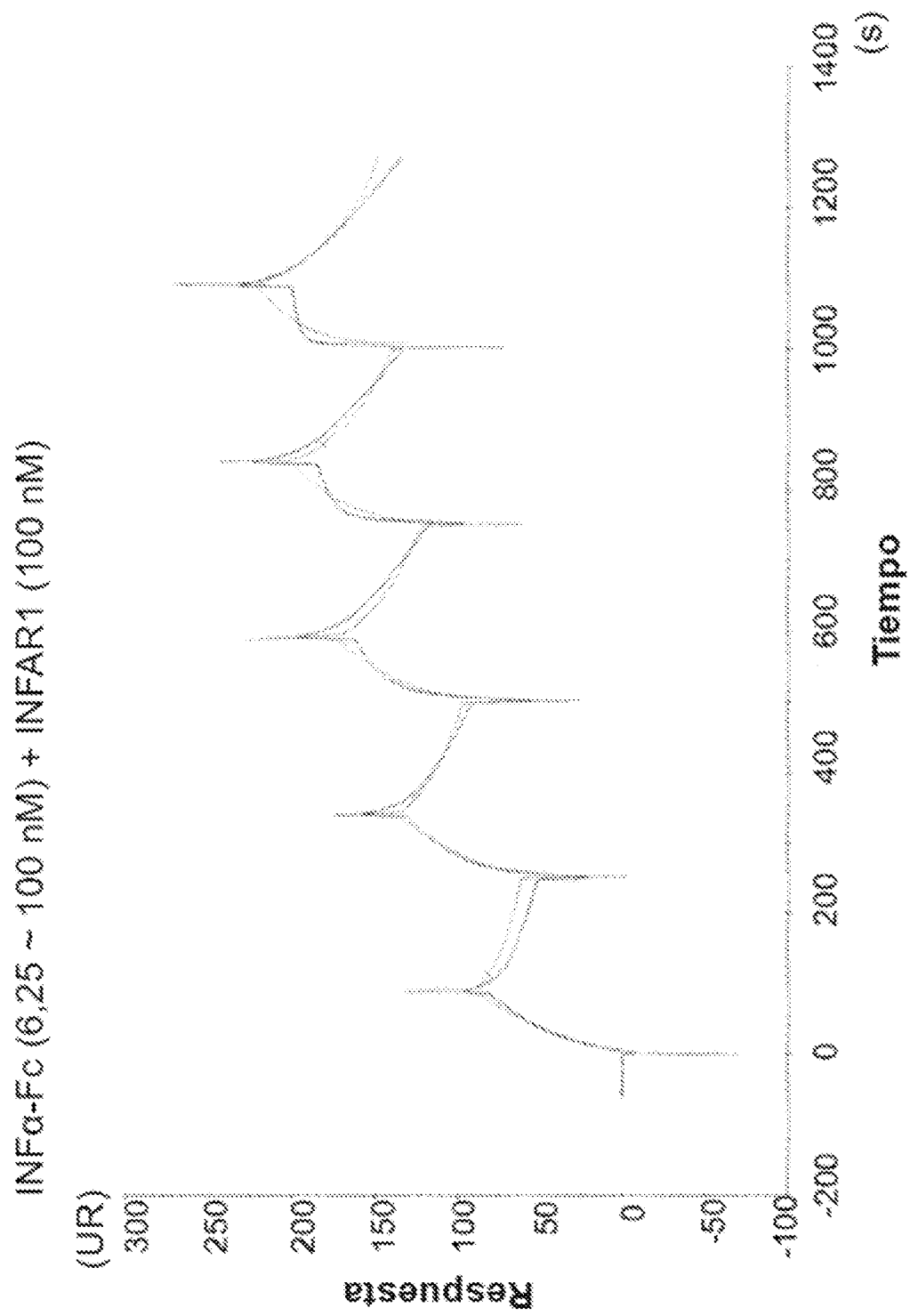


Figura 12B

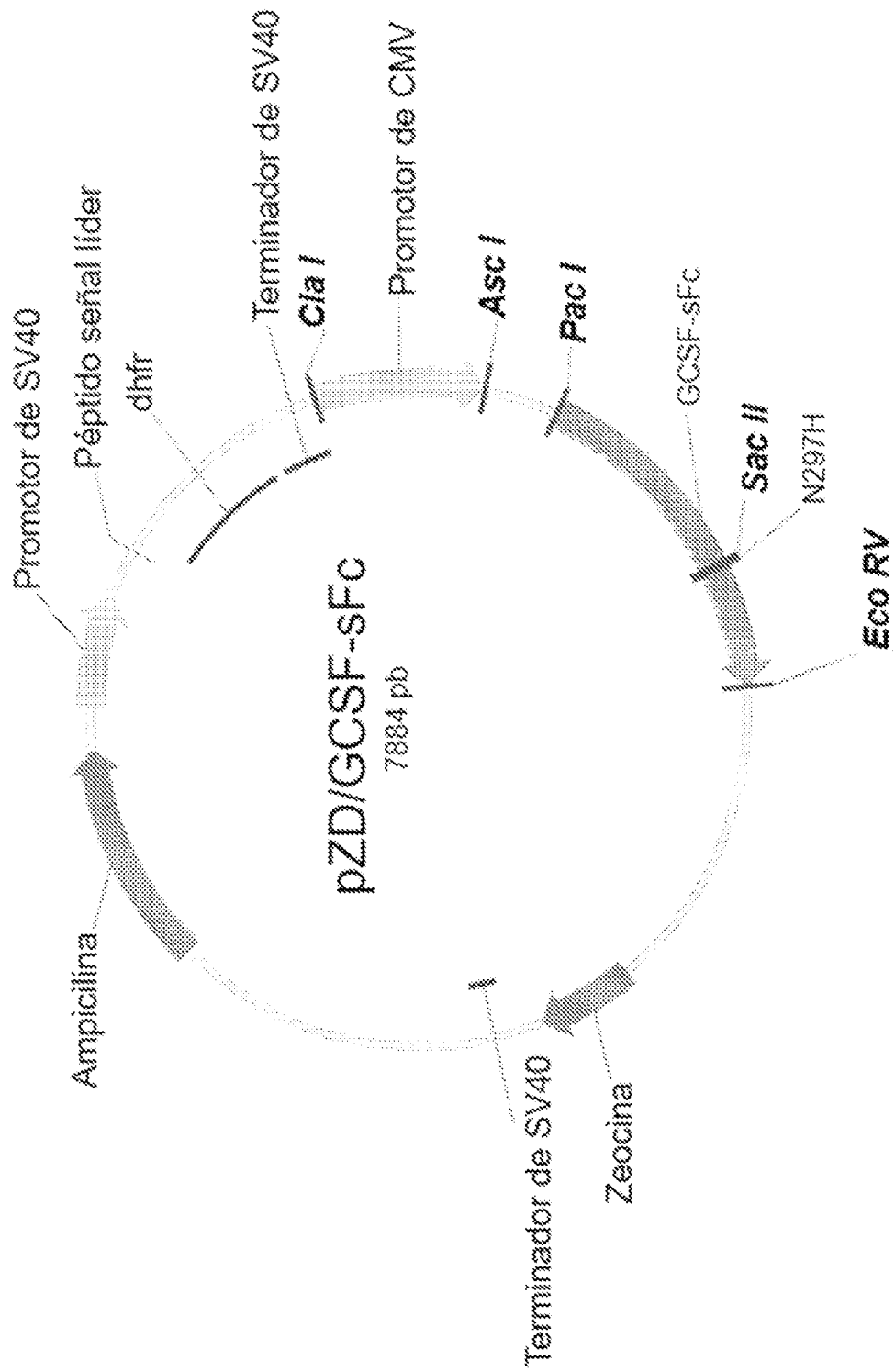


Figura 13

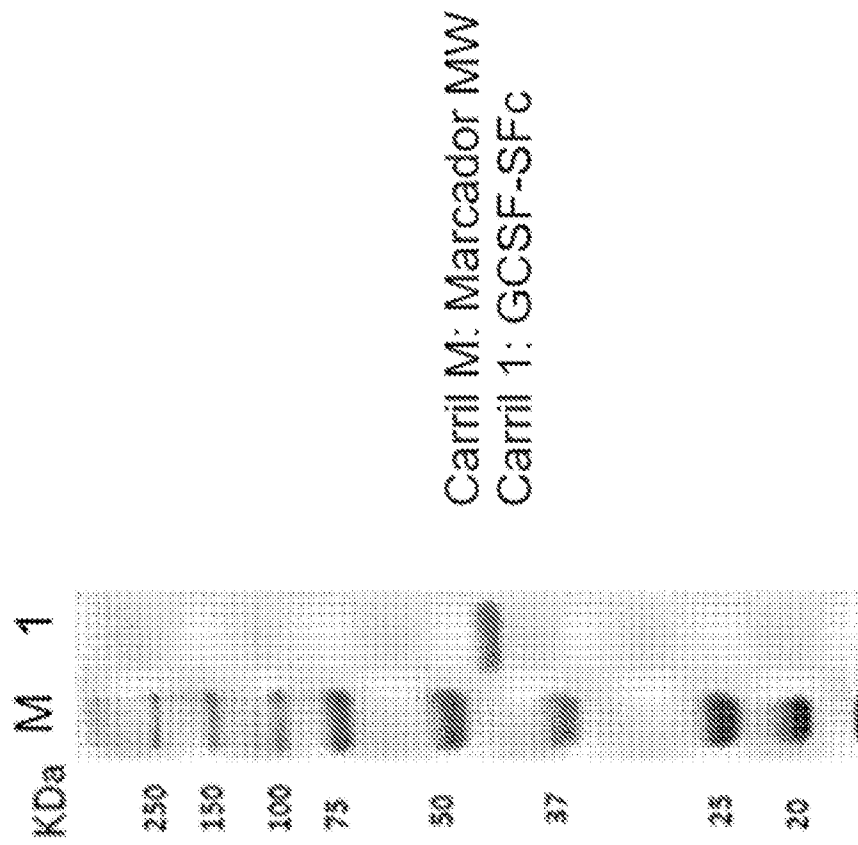


Figura 14

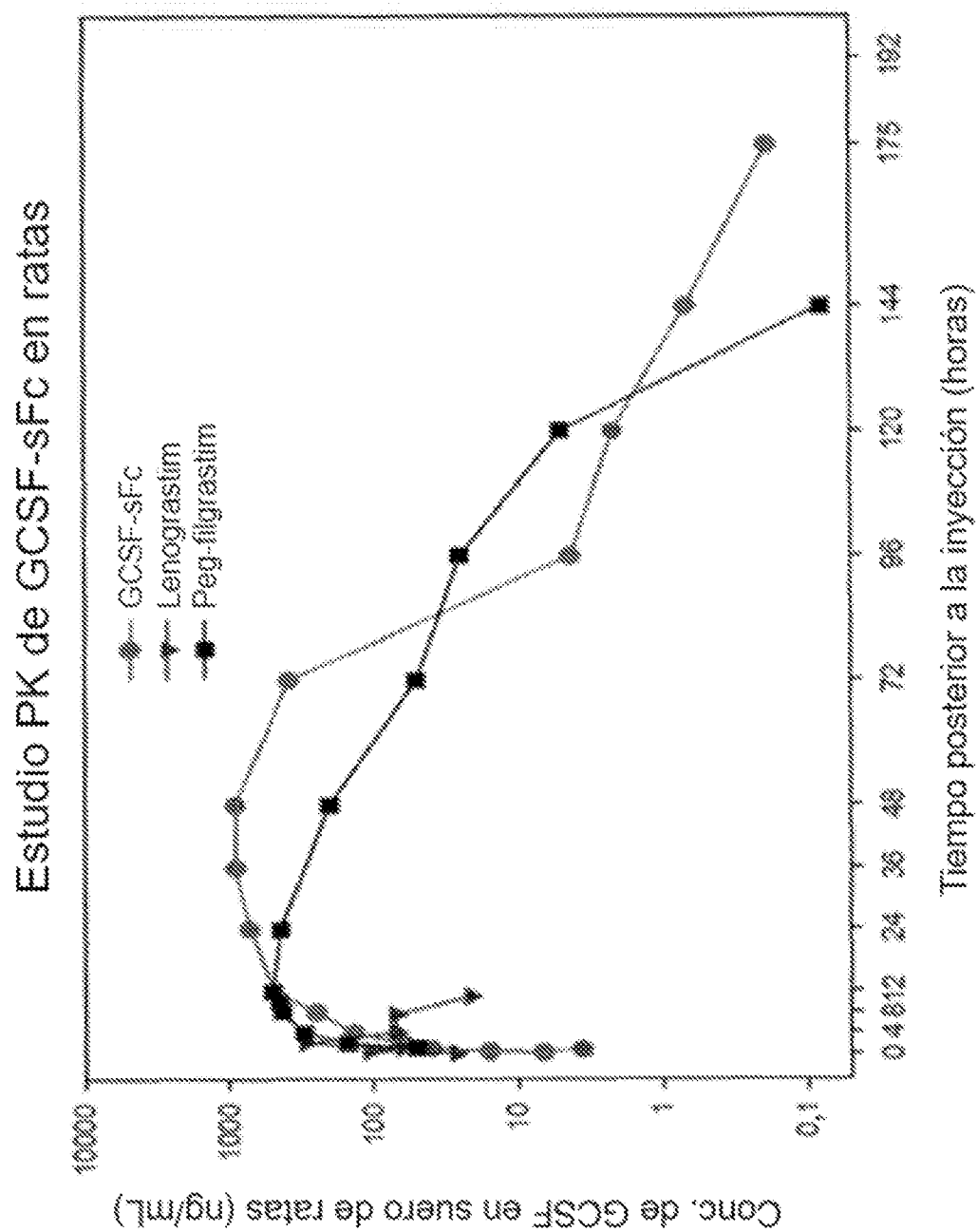


Figura 15

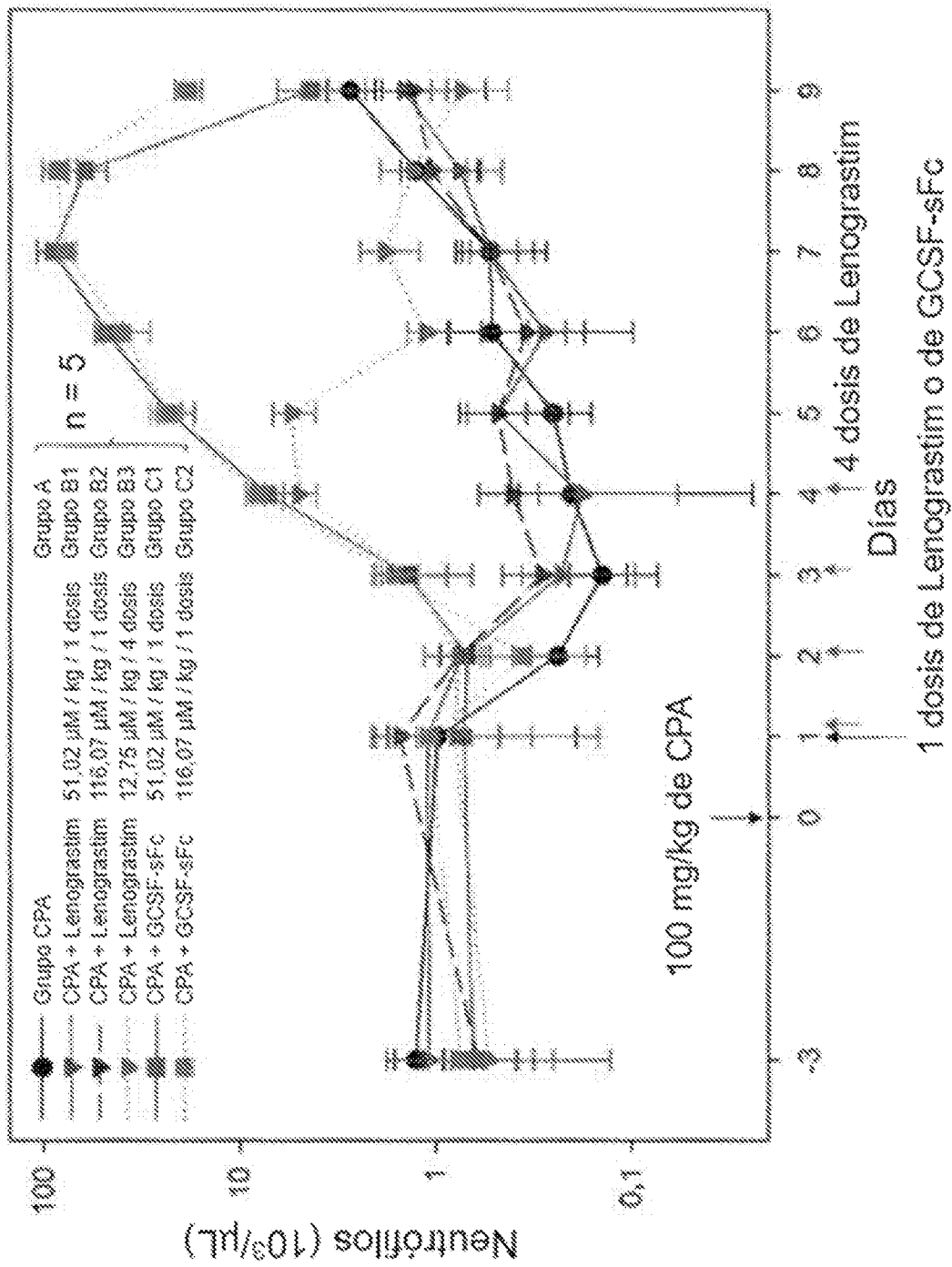


Figura 16

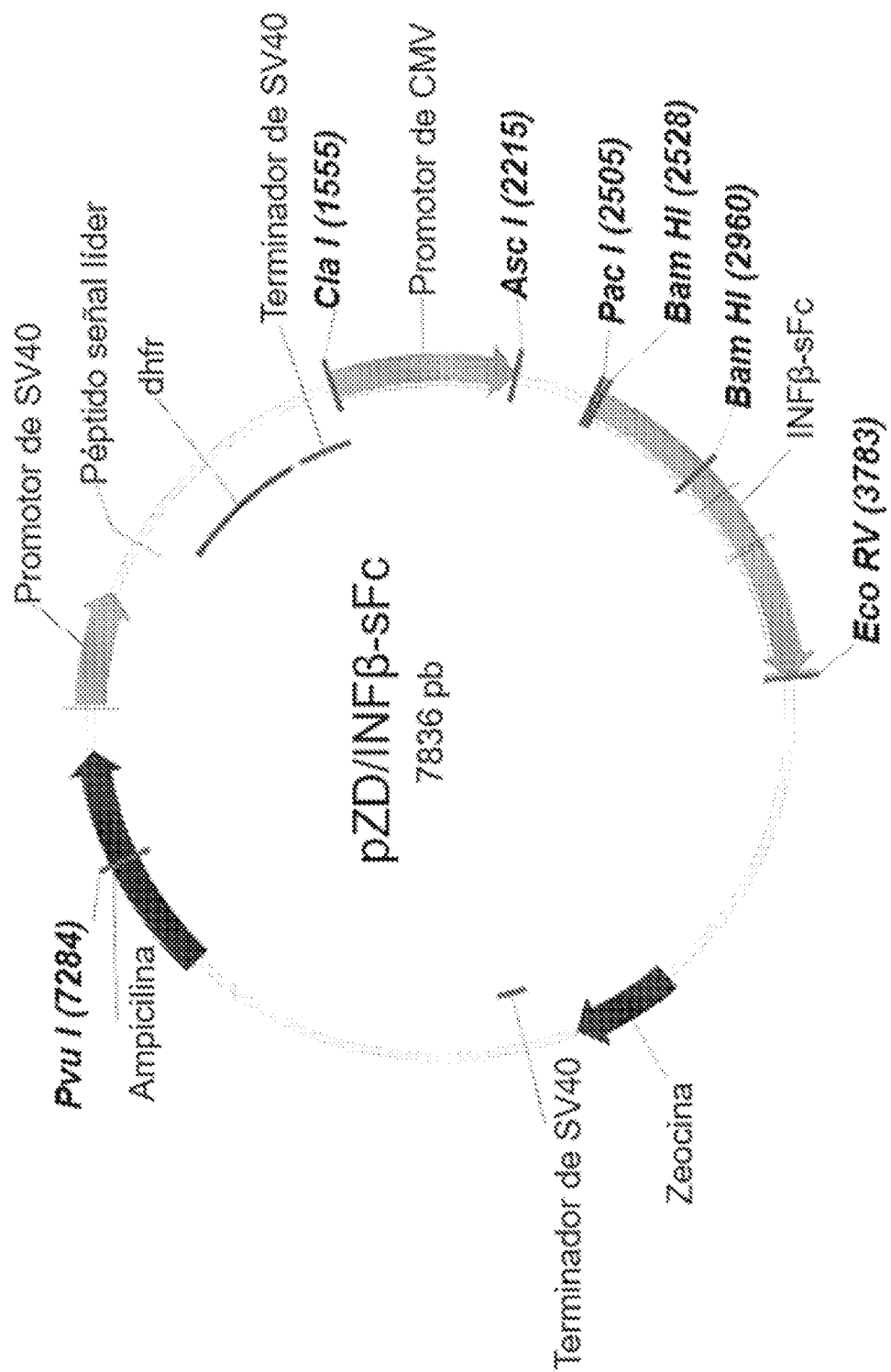


Figura 17

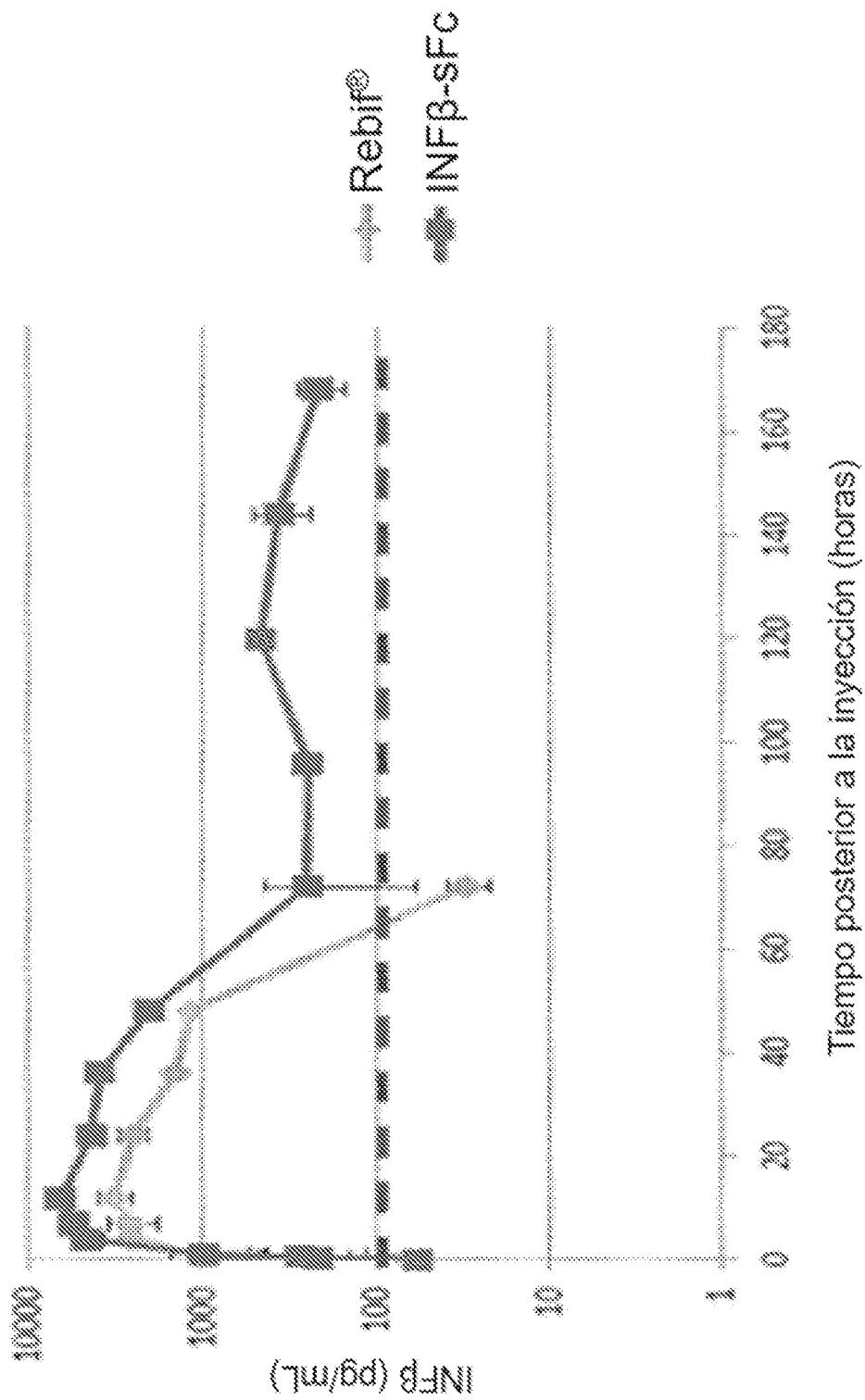


Figura 18

Ensayo de inhibición de osteopontina medida en células
CD3⁺ en la presencia de un anticuerpo anti-CD28

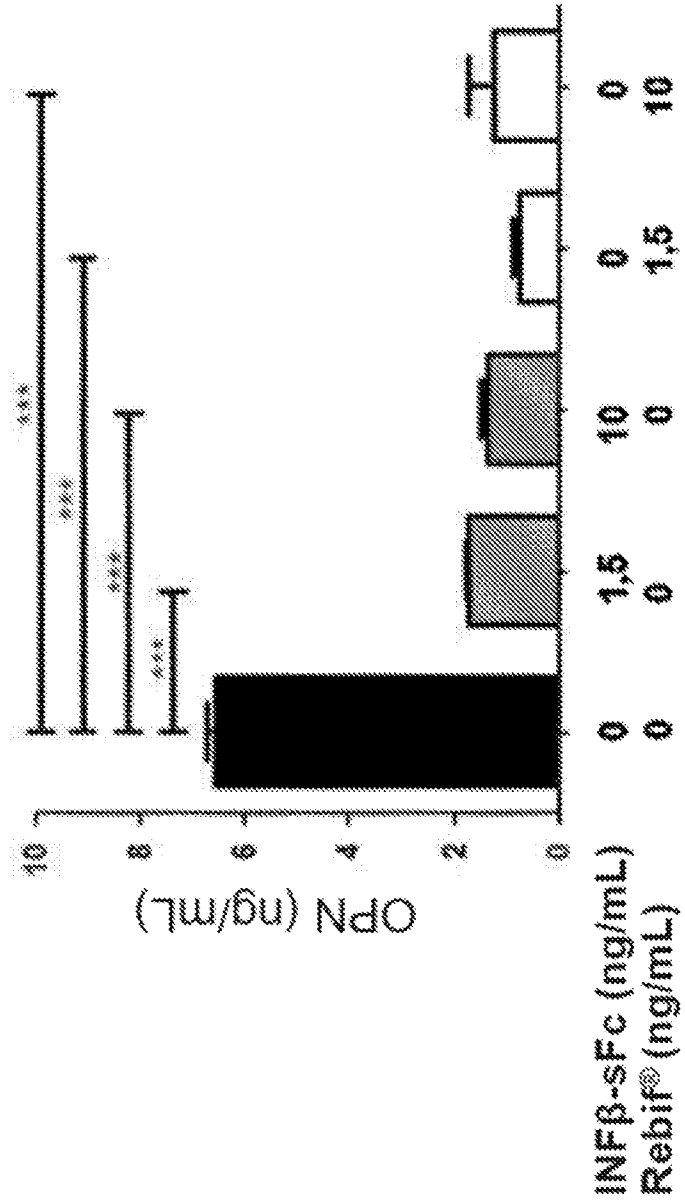


Figura 19