

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 667 558**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/62** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 14/575** (2006.01)  
**C07K 14/715** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2013 PCT/US2013/044552**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184939**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 13799943 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2874639**

---

(54) Título: **Polipéptidos de fusión que comprenden una proteína activa unida a un polipéptido con dominio mucina**

(30) Prioridad:

**08.06.2012 US 201261657264 P**  
**08.06.2012 US 201261657378 P**  
**08.06.2012 US 201261657285 P**  
**06.11.2012 US 201261723081 P**  
**13.03.2013 US 201361778575 P**  
**13.03.2013 US 201361778812 P**

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

**11.05.2018**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**ALVAREZ, JUAN;**  
**CHAMOUN, JEAN y**  
**LOSEY, HEATHER, C.**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 667 558 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

Polipéptidos de fusión que comprenden una proteína activa unida a un polipéptido con dominio mucina

5 Antecedentes de la invención

La farmacocinética, la farmacodistribución, la solubilidad, la estabilidad, la potenciación de la función efectora y la unión al receptor de los productos terapéuticos de tipo proteína pueden verse influidos significativamente por el resto carbohidrato de las proteínas glicosiladas. Además, muchos péptidos y proteínas biológicamente activos tienen una solubilidad limitada, o se agregan durante las producciones recombinantes, lo que requiere procedimientos complejos de solubilización y replegamiento. Además, los compuestos terapéuticos de tipo proteína y péptido con pesos moleculares inferiores a 60 kilodaltons (kD) a menudo tienen semividas cortas debido a la depuración renal.

10 Las estrategias actuales empleadas para prolongar la semivida sérica de los compuestos terapéuticos de tipo proteína se engloban principalmente en dos categorías generales: 1) utilización de reciclado mediado por FcRn y 2) aumento del volumen hidrodinámico. Los enfoques específicos que se han descrito incluyen conjugación, unión o fusión a proteínas o dominios de unión a FcRn (Fc, albúmina) para la primera estrategia, y multimerización, acoplamiento químico a polímeros o hidratos de carbono (como PEG, ácido colomínico o hidroxietil almidón), incorporación de sitios de N-glicosilación para la última. Sin embargo, la producción de proteínas de fusión Fc es un proceso lento, ineficiente y costoso que requiere etapas de fabricación adicionales y, a menudo, procedimientos de purificación complejos. Además, las estrategias de acoplamiento químico, siendo la PEGilación la más ampliamente utilizada, dan como resultado un aumento significativo en los costes de producción debido a la adición de etapas de conjugación y purificación y rendimientos globales reducidos. Recientemente, se han descrito también otros imitadores de PEG recombinantes producidos por fusión de una secuencia polipeptídica larga y flexible, como los descritos en el documento U.S. 2010/0239554 A1. Aunque esta tecnología evita la etapa de conjugación adicional, la secuencia peptídica añadida, que no es endógena, tiene el potencial de inmunogenicidad. El documento WO 2010/091122 divulga proteínas de fusión que comprenden una proteína biológicamente activa, tal como IL-1Ra y exendina-4, y un polipéptido XTEN; donde el polipéptido XTEN mejora las propiedades farmacocinéticas, tales como la semivida, de la proteína activa. Las proteínas mucina y los dominios de mucina de proteínas contienen un alto grado de glicosilación, lo que estructuralmente permite que las proteínas de mucina y otros polipéptidos que comprenden dominios de mucina se comporten como espirales aleatorias rígidas. Esta estructura en espiral aleatoria rígida en combinación con los hidratos de carbono hidrófilos ramificados hidrófilos que constituyen los dominios de mucina fuertemente glucosilados es particularmente útil para aumentar el radio hidrodinámico de la proteína activa más allá de lo que se esperaría basado en el peso molecular de la proteína expresada. También 20 debido al alto nivel de glicosilación, la adición de un dominio mucina tiene el potencial de modificar las propiedades fisicoquímicas de una proteína tales como la carga, la solubilidad y las propiedades viscoelásticas de las soluciones concentradas de la proteína activa.

25

30

35

40 Las composiciones de la proteína de fusión y los métodos de la presente invención mejoran las propiedades biológicas, farmacológicas, de seguridad y/o farmacéuticas de una proteína activa.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un polipéptido con dominio mucina unido covalentemente a una proteína activa que tiene propiedades mejoradas (por ejemplo, propiedades farmacocinéticas y/o fisicoquímicas) en comparación con la misma proteína activa no unida al polipéptido con dominio mucina, así como a métodos para producir y usar las proteínas de fusión de la invención.

50 En una realización, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende un polipéptido con dominio mucina unido a una proteína activa mediante un enlazador opcional en el que el polipéptido con dominio mucina está glicosilado y comprende la SEQ ID NO: 20 o cualquier secuencia de aminoácidos homóloga a la misma con al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, en el que la proteína activa es IL-1Ra o exendina-4 o cualquier secuencia de aminoácidos idéntica a la misma con al menos 90 % de identidad de secuencia; y en el que la semivida de la proteína de fusión aumenta dos veces en comparación con la semivida de la proteína activa correspondiente que no está fusionada con el polipéptido con dominio mucina.

55

En una realización, la invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión de la invención, así como vectores y células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos de la invención.

60 En una realización, la invención proporciona métodos para prolongar la semivida sérica de una proteína activa terapéutica que comprende:

- a) proporcionar una proteína activa terapéutica, en la que la proteína activa es IL-1Ra o exendina-4 o cualquier secuencia de aminoácidos idéntica a la misma con al menos 90 % de identidad de secuencia;
- 65 b) unir la proteína activa terapéutica a un polipéptido con dominio mucina que comprende la SEQ ID NO: 20 para formar una proteína de fusión; y

c) medir la semivida sérica de la proteína de fusión después de la administración de una dosis terapéuticamente eficaz a un sujeto y determinar que la semivida se ha incrementado en comparación con la proteína terapéutica correspondiente sola cuando también se administra a una dosis terapéutica comparable. En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión de la invención.

5 En una realización, la invención proporciona las composiciones farmacéuticas de la invención para su uso en medicina

10 Breve descripción de los dibujos

15 FIG. 1. Gel de SDS/poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (A) y gel de IEF (B) de construcciones de mucina IL1Ra. Las flechas indican las proteínas de interés. La multiplicidad de bandas de gel IEF indica especies cargadas de forma diferente, muy probablemente debido a diferencias en la N-glicosilación

20 FIG. 2. Cromatograma de filtración en gel de RDB1813 (gris) y patrones de tamaño molecular (negro). Los pesos moleculares de los patrones y el peso molecular aparente de RDB1813 se indican encima de cada pico de elución.

25 FIG. 3. Cromatograma de filtración en gel de RDB1814 (gris) y patrones de tamaño molecular (negro). Los pesos moleculares de los patrones y el peso molecular aparente de RDB1814 se indican encima de cada pico de elución.

30 FIG. 4. Cromatograma de filtración en gel de RDB1826 (gris) y patrones de tamaño molecular (negro). Los pesos moleculares de los patrones y el peso molecular aparente de RDB1826 se indican encima de cada pico de elución.

35 FIG. 5. Cromatograma de filtración en gel de RDB1815 (gris) y patrones de tamaño molecular (negro). Los pesos moleculares de los patrones y el peso molecular aparente de RDB1815 se indican encima de cada pico de elución.

40 FIG. 6. Cromatograma de filtración en gel de RDB1816 (gris) y patrones de tamaño molecular (negro). Los pesos moleculares de los patrones y el peso molecular aparente de RDB1816 se indican encima de cada pico de elución.

45 FIG. 7. Inhibición de la señalización de IL1 $\beta$  por RDB1813 (2TR) y RDB1814 (4TR) en el ensayo HEK-blue. Actividad de IL1 $\beta$  (.....■.....) como una función de su concentración en ausencia de inhibición. La inhibición por RDB1813 (---X---), RDB1814 (.....▲.....) y IL1Ra (Anakinra .....◆.....) se midieron en la presencia de 15pM de IL1 $\beta$ . Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los valores estimados de IC<sub>50</sub> se indican en la esquina superior derecha de la figura.

50 FIG. 8. Inhibición de la señalización de IL1 $\beta$  por RDB1826 (6TR) en el ensayo HEK-blue. Actividad de IL1 $\beta$  (.....■.....) como una función de su concentración en ausencia de inhibición. La inhibición por RDB1826 (.....▲.....) y IL1Ra (Anakinra .....◆.....) se midieron en la presencia de 15pM de IL1 $\beta$ . Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los valores estimados de IC<sub>50</sub> se indican en la esquina superior derecha de la figura.

55 FIG. 9. Inhibición de la señalización de IL1 $\beta$  por RDB1815 (8TR) y RDB1816 (12TR) en el ensayo HEK-blue. Actividad de IL1 $\beta$  (.....■.....) como una función de su concentración en ausencia de inhibición. La inhibición por RDB1815 (---X---), RDB1816 (.....▲.....) y IL1Ra (Anakinra .....◆.....) se midieron en la presencia de 15pM of IL1 $\beta$ . Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los valores estimados de IC<sub>50</sub> se indican en la esquina superior derecha de la figura.

60 FIG. 10. Mediciones de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) de la unión de RDB1813 al receptor IL1RI de ratón inmovilizado. Los sensogramas y las curvas ajustadas se muestran en gris y negro, respectivamente. Los parámetros cinéticos de RDB1813 y anakinra (datos no mostrados) se muestran en el recuadro.

FIG. 11. Mediciones de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) de la unión de RDB1814 al receptor IL1RI de ratón inmovilizado. Los sensogramas y las curvas ajustadas se muestran en gris y negro, respectivamente. Los parámetros cinéticos de RDB1814 y anakinra (datos no mostrados) se muestran en el recuadro.

FIG. 12. Mediciones de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) de la unión de RDB1826 al receptor IL1RI de ratón inmovilizado. Los sensogramas y las curvas ajustadas se muestran en gris y negro, respectivamente. Los parámetros cinéticos de RDB1826 y anakinra (datos no mostrados) se muestran en el recuadro.

FIG. 13. Mediciones de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) de la unión de RDB1815 al receptor IL1RI de ratón inmovilizado. Los sensogramas y las curvas ajustadas se muestran en gris y negro, respectivamente. Los parámetros cinéticos de RDB1815 y anakinra (datos no mostrados) se muestran en el recuadro.

FIG. 14. Mediciones de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) de la unión de RDB1816 al receptor IL1RI de ratón inmovilizado. Los sensogramas y las curvas ajustadas se muestran en gris y negro, respectivamente. Los parámetros cinéticos de RDB1816 y anakinra (datos no mostrados) se muestran en el recuadro.

FIG. 15. Diseño experimental para la evaluación de RDB1816 en el modelo de inflamación CAIA de ratón.

Fig. 16. Los efectos inhibidores de una sola inyección de 20 mg/kg de RDB1816 (---●---), IL1Ra (Anakinra ---◆---), y control de solución salina (---○---) en el modelo de inflamación CAIA de ratón. Las flechas negras indican los días de inyección con el cóctel de anticuerpos monoclonales (mAb) y con LPS y molécula de tratamiento. Se utilizó un grupo de ocho ratones para cada tratamiento y cada punto de tiempo representa la media de cada grupo.

FIG. 17. Perfil farmacocinético de RDB1815 y RDB186 en rata. Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se registran para RDB1815 i.v. (---●---, inyección única de 2,1 mg/Kg [mpk]), inyección SC (---■---, inyección única

de 5,6 mpk) y para RDB1816 i.v. (▲▲▲▲, inyección única 2,4 mpk), inyección SC (▲▲▲, inyección única 6,4 mpk). Los símbolos representan la media de tres ratas diferentes por condición. Los parámetros farmacocinéticos para los grupos SC se resumen en la tabla.

5 FIG. 18. Gel de SDS/poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de la construcción de mucina exendina-4 RDB2203.

FIG. 19. Cromatograma de filtración en gel de RDB2203 (gris) y patrones de tamaño molecular (gris). Los pesos moleculares de los patrones se indican encima de cada pico de elución.

FIG. 20. Ensayo de actividad GLP-1R para RDB2203 y exendina-4.

FIG. 21. Perfil farmacocinético de RDB2203.

## 10 Descripción detallada de la invención

A continuación se incluye una descripción de las realizaciones preferidas de la invención.

### 15 Definiciones

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario.

20 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un(o)", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas.

25 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar no interrumpido por aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado, por ejemplo, mediante formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como la conjugación con un componente de marcado.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen, pero no se limitan a, glicina y ambos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Para designar los aminoácidos se usan los códigos estándar de una o tres letras.

35 La expresión "no natural", tal como se aplica a las secuencias y tal como se usa en la presente memoria, significa secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas que no tienen homólogas a, no son complementarias a, o no tienen un alto grado de homología con una secuencia de tipo silvestre o natural encontrada en un mamífero. Por ejemplo, un polipéptido no natural puede compartir no más del 99 %, 98 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % o incluso menos identidad de secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia natural cuando esté adecuadamente alineado.

40 Los términos "glicosilación" y "glicosilada" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a la porción de carbohidrato de una proteína o al proceso mediante el cual los azúcares se unen postraduccionalmente a las proteínas durante su producción en las células para formar glicoproteínas. La glicosilación de proteínas es un evento postraduccional y se refiere a la unión de glucanos a serina y treonina y, en menor medida a hidroxiprolina e hidroxilisina en el caso de la glicosilación ligada a O, o asparagina, en el caso de la glicosilación ligada a N.

45 Un "fragmento" es una forma truncada de una proteína activa nativa que retiene al menos una porción de la actividad terapéutica y/o biológica. Una "variante" es una proteína con homología de secuencia con la proteína activa nativa que retiene al menos una porción de la actividad terapéutica y/o biológica de la proteína activa. Por ejemplo, una proteína variante puede compartir al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína activa de referencia. Como se usa en la presente memoria, la expresión "resto de proteína activa" incluye proteínas modificadas deliberadamente, como por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, inserciones, o accidentalmente a través de mutaciones.

50 Una "célula hospedadora" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para los vectores sujeto. Las células hospedadoras incluyen la progenie de una única célula hospedadora. La progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en genómica del complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula hospedadora incluye 55 células transfectadas *in vivo* con un vector de esta invención.

60 "Aislado" cuando se usa para describir los diversos polipéptidos divulgados en la presente memoria, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que generalmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Como será evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína,

anticuerpo o fragmentos del mismo de origen no natural no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su homólogo natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo, o fragmentos del mismo, "concentrado", "separado" o "diluido", se distingue de su homólogo natural en que la concentración o el número de moléculas por volumen es generalmente mayor que la de su homólogo natural. En general, un polipéptido producido por medios recombinantes y expresado en una célula hospedadora se considera "aislado".

Un polinucleótido o un ácido nucleico que codifica un polipéptido u otro ácido nucleico que codifica polipéptidos "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislada es distinta de la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido específico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislada incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos contenidas en células que ordinariamente expresan el polipéptido donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica o extracromosómica diferente a la de las células naturales.

"Conjugado", "unido", "fusionado" y " fusión" se usan indistintamente en la presente memoria. Estos términos se refieren a la unión de dos elementos o componentes químicos más, por cualquier medio que incluya conjugación química o medios recombinantes. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y están en fase o en marco de lectura. Una " fusión en marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) para formar un ORF continuo más largo, de una manera que mantiene el marco de lectura correcto de los ORF originales. Por lo tanto, la proteína de fusión recombinante resultante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos normalmente no están unidos en la naturaleza).

En el contexto de polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección del extremo amino al carboxilo en el que los restos que se encuentran próximos en la secuencia están contiguos en la estructura primaria del polipéptido. Una "secuencia parcial" es una secuencia lineal de parte de un polipéptido que se sabe que comprende restos adicionales en una o ambas direcciones.

"Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, una secuencia rica en glicina eliminada de su secuencia codificante nativa y unida operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es una secuencia heteróloga rica en glicina. El término "heterólogo" tal como se aplica a un polinucleótido, un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara.

Los términos "polinucleótidos", "ácidos nucleicos", "nucleótidos" y "oligonucleótidos" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir del análisis de ligamiento, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si está presente, pueden impartirse modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos.

"Recombinante" como se aplica a un polinucleótido significa que el polinucleótido es el producto de varias combinaciones de etapas de clonación, restricción y/o ligamiento *in vitro*, y otros procedimientos que dan como resultado una construcción que puede expresarse potencialmente en una célula hospedadora.

El término "gen" o la expresión "fragmento de gen" se usan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar una proteína particular después de transcribirse y traducirse. Un gen o fragmento de gen puede ser genómico o de ADNc, siempre que el polinucleótido contenga al menos un marco de lectura abierto, que puede cubrir toda la región de codificación o un segmento de la misma. Un "gen de fusión" es un gen compuesto por al menos dos polinucleótidos heterólogos que están unidos entre sí.

"Homología" u "homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o intercambiabilidad entre dos o más secuencias de polinucleótidos o dos o más secuencias de polipéptidos. Cuando se usa un programa como BestFit para determinar la identidad de secuencia, similitud u homología entre dos secuencias de aminoácidos diferentes, se pueden usar las configuraciones predeterminadas, o se puede seleccionar una matriz de puntuación apropiada, como blosum45 o blosum80, para optimizar la identidad, la similitud o puntuaciones de homología. Preferiblemente, los polinucleótidos

que son homólogos son aquellos que se hibridan en condiciones rigurosas como se define en la presente memoria y tienen al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente 95 %, más preferiblemente 97 %, más preferiblemente 98 % e incluso más preferiblemente el 99 % de identidad de secuencia con esas secuencias.

- 5 Las expresiones "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" incluyen referencias a condiciones en las cuales un polinucleótido se hibridará con su secuencia diana, en un grado detectablemente mayor que otras secuencias (p.ej., al menos 2 respecto al fondo). Generalmente, la rigurosidad de la hibridación se expresa, en parte, con referencia a la temperatura y la concentración de sal bajo la cual se lleva a cabo la etapa de lavado.
- 10 Generalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,5 M de iones Na, generalmente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para polinucleótidos cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para polinucleótidos largos (p.ej., más de 50 nucleótidos), por ejemplo, las "condiciones rigurosas" pueden incluir hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y tres lavados durante 15 min cada uno en 0,1 × SSC/1 % de SDS a 60 a 65 °C. Como alternativa, se pueden usar temperaturas de aproximadamente 65 °C, 60 °C, 55 °C o 42 °C. La concentración de SSC puede variar de aproximadamente 0,1 a 2xSSC, estando presente SDS a aproximadamente 0,1 %. Dichas temperaturas de lavado generalmente se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C a 20 °C por debajo del punto de fusión térmico para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tm es la temperatura (con una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. Una ecuación para calcular la Tm y las condiciones para la hibridación de ácido nucleico es bien conocida y se puede encontrar en Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.; específicamente, véase el Volumen 2 y el Capítulo 9.
- 15 Generalmente, los reactivos de bloqueo se usan para bloquear la hibridación no específica. Dichos reactivos de bloqueo incluyen, por ejemplo, ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado a aproximadamente 100-200 µg/ml. El disolvente orgánico, tal como formamida a una concentración de aproximadamente 35-50 % v/v, también se puede usar en circunstancias particulares, tal como para hibridaciones de ARN:ADN. Las variaciones útiles en estas condiciones de lavado serán evidentes para los expertos en la materia.
- 20
- 25
- 30 Las expresiones "porcentaje de identidad" y "% de identidad", tal como se aplican a las secuencias de polinucleótidos, se refieren al porcentaje de coincidencias de restos entre al menos dos secuencias de polinucleótidos alineadas usando un algoritmo estandarizado. Dicho algoritmo puede insertar, de forma estandarizada y reproducible, espacios en las secuencias que se están comparando para optimizar la alineación entre dos secuencias, y por lo tanto lograr una comparación más significativa de las dos secuencias. El porcentaje de identidad puede medirse a lo largo de una secuencia de polinucleótidos definida completa, por ejemplo, tal como se define mediante un número de SEQ ID particular, o puede medirse en una longitud más corta, por ejemplo, a lo largo de la longitud de un fragmento tomado de un fragmento más grande, secuencia de polinucleótidos definida, por ejemplo, un fragmento de al menos 45, al menos 60, al menos 90, al menos 120, al menos 150, al menos 210 o al menos 450 restos contiguos. Dichas longitudes son solamente a modo de ejemplo, y se entiende que cualquier longitud de fragmento soportada por las secuencias mostradas aquí, en las Tablas, Figuras o Listado de Secuencias, se puede usar para describir una longitud sobre la que se puede medir el porcentaje de identidad.
- 35
- 40
- 45 "Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias polipeptídicas identificadas en la presente memoria, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia de consulta que son idénticos a los restos de aminoácidos de una segunda secuencia polipeptídica de referencia o porción de la misma, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR).
- 50 Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr una alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. El porcentaje de identidad puede medirse a lo largo de una secuencia polipeptídica definida completa, por ejemplo, como se define mediante un número de SEQ ID particular, o puede medirse en una longitud más corta, por ejemplo, a lo largo de un fragmento tomado de un fragmento más grande, secuencia polipeptídica definida, por ejemplo, por un fragmento de al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 70 o al menos 150 restos contiguos. Dichas longitudes son solamente a modo de ejemplo, y se entiende que cualquier longitud de fragmento soportada por las secuencias mostradas en la presente memoria, en las Tablas, Figuras o Listado de Secuencias, se puede usar para describir una longitud sobre la que se puede medir el porcentaje de identidad.
- 55
- 60
- 65 Un "vector" es una molécula de ácido nucleico, preferiblemente autorreplicante en un hospedador apropiado, que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células hospedadoras. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula, la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula

hospedadora apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido(s). Un "sistema de expresión" normalmente connota una célula hospedadora adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

5 "Resistencia a la degradación", tal como se aplica a un polipéptido, se refiere a la capacidad de los polipéptidos para resistir la degradación en sangre o componentes de los mismos, que generalmente implica proteasas en el suero o plasma, o dentro de una formulación destinada a almacenamiento o administración de un vehículo para una proteína. La resistencia a la degradación puede medirse combinando la proteína con sangre, suero, plasma humanos (o de ratón, rata, mono, según corresponda), o una formulación, generalmente durante un intervalo de días (p.ej., 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 días), a temperaturas específicas tales como -80 °C, -20 °C, 0 °C, 4 °C, 25 °C y 37 °C. La proteína intacta en las muestras se mide utilizando técnicas convencionales de cuantificación de proteínas. El punto temporal en el que se degrada el 50 % de la proteína es la "semivida de degradación" de la proteína.

10 15 El término "semivida" generalmente se refiere al tiempo requerido para que la concentración plasmática de un fármaco se reduzca a la mitad. Los términos y expresiones "semivida", "t<sub>1/2</sub>", "semivida de eliminación "y" semivida circulante "se usan indistintamente en este documento.

20 25 30 El "radio hidrodinámico" es el radio aparente (R<sub>h</sub> en nm) de una molécula en una solución calculada a partir de propiedades difusionales. El "radio hidrodinámico" de una proteína afecta a su velocidad de difusión en solución acuosa, así como a su capacidad para migrar en geles de macromoléculas. El radio hidrodinámico de una proteína está influenciado por su peso molecular, así como por su estructura, incluyendo la forma y la compacidad, y su estado de hidratación. Los métodos para determinar el radio hidrodinámico son bien conocidos en la técnica, tal como mediante el uso de DLS y cromatografía de exclusión por tamaño. La mayoría de las proteínas tienen estructura globular, que es la estructura tridimensional más compacta que una proteína puede tener con el radio hidrodinámico más pequeño. Algunas proteínas adoptan una conformación aleatoria y abierta, no estructurada o "lineal" y como resultado tienen un radio hidrodinámico mucho mayor en comparación con las proteínas globulares típicas de peso molecular similar.

35 40 45 50 Las "condiciones fisiológicas" se refieren a un conjunto de condiciones en un hospedador vivo, así como a las condiciones *in vitro*, incluyendo temperatura, concentración de sal, pH, que imitan esas condiciones de un sujeto vivo. Se han establecido una serie de condiciones fisiológicamente relevantes para su uso en ensayos *in vitro*. Generalmente, un tampón fisiológico contiene una concentración fisiológica de sal y se ajusta a un pH neutro que varía de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8, y preferiblemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. Una variedad de tampones fisiológicos se enumeran en Sambrook et al. (1989). La temperatura fisiológicamente relevante varía de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 38 °C, y preferiblemente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C.

55 60 65 "Agente de liberación controlada", "agente de liberación lenta", "formulación de depósito" o "agente de liberación sostenida" se usan indistintamente para referirse a un agente capaz de prolongar la duración de la liberación de un polipéptido de la invención en relación con la duración de la liberación cuando el polipéptido se administra en ausencia de agente. Diferentes realizaciones de la presente invención pueden tener diferentes velocidades de liberación, dando como resultado diferentes cantidades terapéuticas.

70 75 80 85 El término "antagonista", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en la presente memoria. Los métodos para identificar antagonistas de un polipéptido pueden comprender poner en contacto un polipéptido nativo con una molécula antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido nativo. En el contexto de la presente invención, los antagonistas pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, anticuerpos o cualquier otra molécula que disminuya el efecto de una proteína activa.

90 95 100 El término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en la presente memoria. Las moléculas agonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas, fragmentos o variantes de secuencias nativas de aminoácidos de polipéptidos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas de un polipéptido nativo pueden comprender poner en contacto un polipéptido nativo con una molécula agonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido nativo.

105 110 115 120 "Actividad" para los fines de la presente invención se refiere a una acción o efecto de un componente de una proteína de fusión consistente con la de la proteína activa nativa correspondiente, en la que "actividad biológica" o "bioactividad" se refiere a una función o efecto biológico *in vitro* o *in vivo*, que incluye, pero no se limita a, unión a un receptor, actividad antagonista, actividad agonista o una respuesta celular o fisiológica.

125 130 135 Como se usa en la presente memoria, "tratamiento" o "tratar" o "aliviar" o "mejorar" se usan de forma indistinta en la presente memoria. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados que

incluyen, pero no se limitan a, un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o la mejora del trastorno subyacente que se está tratando. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de modo que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto todavía puede estar afectado

5 por el trastorno subyacente. Para beneficio profiláctico, las composiciones se pueden administrar a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un sujeto que refiere uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad.

10 Un "efecto terapéutico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un efecto fisiológico, que incluye pero no se limita a la cura, mitigación, mejora o prevención de enfermedades en humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de los seres humanos o animales, provocados por una proteína de fusión de la invención distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico poseído por la proteína activa. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en este documento.

15 Las expresiones "cantidad terapéuticamente efectiva" y "dosis terapéuticamente efectiva", como se usan en la presente memoria, se refieren a una cantidad de una proteína activa, sola o como parte de una composición de proteína de fusión, que es capaz de tener cualquier efecto beneficioso detectable en cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o características de un estado patológico o afección cuando se administra en una o en dosis 20 repetidas a un sujeto. Tal efecto no necesita ser en absoluto beneficioso.

25 La expresión "régimen posológico terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente memoria, se refiere a un esquema para la administración de dosis consecutivamente de una proteína activa, sola o como parte de una composición de proteína de fusión, en la que las dosis se administran en cantidades terapéuticamente efectivas para dar como resultado un efecto beneficioso sostenido sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o características de un estado patológico o afección.

#### Proteínas de fusión

30 La invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un polipéptido con dominio mucina unido a una proteína activa. Dichas proteínas también se denominan en la presente memoria proteínas "mucinadas". Como se usa en la presente memoria, una "proteína de fusión" de la invención comprende un polipéptido con dominio mucina unido a una proteína activa. En un aspecto, el polipéptido con dominio mucina y la proteína activa normalmente existen en proteínas separadas y se unen en la proteína de fusión; o pueden existir normalmente en la misma proteína pero se colocan en una nueva disposición en la proteína de fusión. Las composiciones y métodos de la invención son particularmente útiles para potenciar las propiedades farmacocinéticas, en particular la semivida de una proteína activa cuando se fusiona con un polipéptido con dominio mucina. En un aspecto, las proteínas de fusión divulgadas en la presente memoria retienen la totalidad o una parte de la actividad biológica y/o terapéutica de la proteína activa correspondiente no unida a un polipéptido con dominio mucina. En un aspecto, la actividad terapéutica/biológica de la proteína activa se mejora cuando se fusiona con un polipéptido con dominio mucina para formar una proteína de fusión. En un aspecto, la proteína de fusión de acuerdo con la invención excluye específicamente moléculas de inmunoglobulina o cualquier molécula que contenga un dominio Fc, o cualquier fragmento del mismo. En un aspecto, la proteína de fusión o cualquier porción de la misma no está glicosilada por  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa o  $\beta$ -1,6-acetilglucosaminiltransferasa. En un aspecto, la proteína de fusión no se une a un anticuerpo específico para  $\alpha$ Gal. En un aspecto, la proteína de fusión de la invención no se une a un anticuerpo específico Gal  $\alpha$ 1, 3Gal.

45 Las proteínas mucina y los dominios mucina de proteínas contienen un alto grado de glicosilación que estructuralmente permite que las proteínas mucina y otros polipéptidos que comprenden dominios mucina se comporten como espirales aleatorias rígidas. Esta estructura en espiral aleatoria rígida en combinación con los hidratos de carbono hidrófilos ramificados que constituyen los dominios de mucina fuertemente glicosilados es particularmente útil para aumentar el radio hidrodinámico de la proteína activa más allá de lo que se esperaría basado en el peso molecular de la proteína expresada. También debido al alto nivel de glicosilación, la adición de un dominio mucina también tiene el potencial de modificar las propiedades fisicoquímicas de una proteína, tales como 50 la carga, la solubilidad y las propiedades viscoelásticas de soluciones concentradas de la proteína activa. Las proteínas de fusión muciladas de la invención tienen varias ventajas respecto a las estrategias de la técnica anterior para prolongar la semivida de las proteínas. Las proteínas de fusión de la invención se pueden producir a través de medios de expresión convencionales sin la necesidad de otras etapas de conjugación y purificación. Los polipéptidos con dominio mucina pueden estar unidos a la proteína activa a través del extremo N o C de la proteína activa. Los 55 polipéptidos con dominio mucina son estructuralmente menos restrictivos que otras parejas de fusión porque son proteínas monoméricas no globulares que tienen un volumen reducido y un menor riesgo de impacto sobre la bioactividad. El uso de dominios mucina disminuye el riesgo de bioactividades endógenas tales como las funciones efectoras Fc. Cuando se usan para preparar agentes terapéuticos humanos, las proteínas de fusión de la invención 60 pueden comprender secuencias completamente humanas con alta glucosilación para reducir el riesgo de inmunogenicidad.

La actividad de las composiciones de proteína de fusión de la invención, que incluyen las características funcionales o la actividad biológica y farmacológica y los parámetros que resultan, se pueden determinar mediante cualquier ensayo de selección adecuado conocido en la técnica para medir la característica deseada. La actividad y la estructura de las proteínas de fusión pueden medirse mediante ensayos descritos en la presente memoria, ensayos de los Ejemplos o mediante métodos conocidos en la técnica para determinar la semivida, el grado de solubilidad, la estructura y la retención de la actividad biológica de las composiciones de la invención, así como comparaciones con proteínas activas que no son proteínas de fusión de la invención.

5 Cuando se hace referencia a la proteína de fusión, el término "unido" o "fusionado" o " fusión" pretende indicar que el 10 polipéptido con dominio mucina y las proteínas activas se expresan como un único polipéptido en las células de una manera que permite la glicosilación unida al O del polipéptido con dominio mucina y mantiene la actividad de la 15 proteína activa. En una realización, el polipéptido con dominio mucina se puede unir opcionalmente a la proteína activa a través de un enlazador de aminoácido. El enlazador de aminoácido puede comprender adicionalmente una secuencia de escisión que puede diseñarse para liberar la proteína activa tras la administración de la proteína de fusión a un sujeto.

20 Opcionalmente, la proteína de fusión que comprende la proteína activa fusionada al polipéptido del dominio mucina se puede fusionar adicionalmente con uno o más restos adicionales destinados a potenciar la actividad o impartir actividades adicionales a la proteína de fusión. En un aspecto, la proteína de fusión comprende la estructura: A-M-B, 25 en la que A es un compañero de fusión N-terminal, M es un dominio mucina y B es un compañero de fusión C-terminal. A y B pueden comprender identidades similares y diferentes. En un aspecto de esta realización, A y B son restos bioactivos que pueden actuar de forma independiente o sinérgica de una manera que incluye, pero no se limita a, agonismo, antagonismo, actividad enzimática, dirigirse a proteínas o células específicas, reactividad química u oligomerización. En otro aspecto, cuando A y B son lo mismo, la mejora de la actividad se lleva a cabo a través de la avidez.

30 Una proteína de fusión de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan juntos en marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos terminados romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, rellenando de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable y ligación enzimática. En otro aspecto, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen 35 sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden ser posteriormente hibridados y reamplificados para generar una secuencia génica químérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1992). Hay comercializados muchos vectores de expresión para utilizar en las fracciones de fusión y 40 se analizarán con más detalle a continuación.

#### 40 Polipéptido con dominio mucina

45 Un "polipéptido con dominio mucina" se define en la presente memoria como cualquier proteína que comprende un "dominio mucina". Un dominio mucina es rico en sitios de glicosilación potenciales, y tiene un alto contenido de serina y/o treonina y prolina, que puede representar más del 40 % de los aminoácidos dentro del dominio mucina. Un dominio mucina está muy glicosilado con glicanos predominantemente enlazados a O. Un polipéptido con 50 dominio mucina tiene al menos aproximadamente un 60 %, al menos un 70 %, al menos 80 %, o al menos 90 % de su masa debido a los glucanos. Los dominios de mucina pueden comprender unidades de repetición de aminoácidos en tandem (también denominadas aquí TR) que pueden variar en longitud desde aproximadamente 8 aminoácidos hasta 150 aminoácidos por cada unidad de repetición en tandem. El número de unidades de repetición en tandem puede variar entre 1 y 25 en un polipéptido con dominio mucina de la invención.

55 Los polipéptidos con dominio mucina divulgados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, proteínas mucina. Una "porción del mismo" significa que el enlazador polipéptido de mucina comprende al menos un dominio mucina de una proteína mucina. Las proteínas mucina incluyen cualquier proteína codificada por un gen MUC (es decir, MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19, MUC20, MUC21). El dominio mucina de una proteína mucina está generalmente flanqueado en ambos lados por regiones de aminoácidos no repetitivos. Un polipéptido con dominio mucina puede comprender la totalidad o una porción de una proteína mucina (por ejemplo, MUC20) que incluye la porción extracelular de la proteína mucina, la porción de secuencia señal de la proteína mucina, el dominio transmembrana de la proteína mucina y/o el dominio citoplasmático de la proteína mucina. Un polipéptido con dominio mucina puede comprender la totalidad o una porción de una proteína mucina de una proteína mucina soluble. Preferiblemente, el polipéptido con dominio mucina comprende la porción extracelular de una proteína mucina.

65 Un polipéptido con dominio mucina también puede comprender la totalidad o una porción de una proteína que comprende un dominio mucina pero que no está codificada por un gen de MUC. Dichas proteínas naturales que no

están codificadas por un gen MUC pero que comprenden dominios mucina incluyen, pero no se limitan a, proteínas ancladas a la membrana tales como inmunoglobulina transmembrana y proteínas de la familia del dominio mucina (TIM), fractalquina (neurotactina), ligando de glucoproteína de P-selectina 1 (PSGL-1, CD162), E-selectina, L-selectina, P-selectina, CD34, CD43 (leucosialina, sialoforina), CD45, CD68, CD96, CD164, GlyCAM-1, MAdCAM, 5 glicoforinas de eritrocitos, glicocalicina, glicoforina, LDL-R, ZP3, endosialina, factor de aceleración de decaimiento (daf, CD55), podocalixina, endoglicano, alfa-distroglicano, neurofascina, EMR1, EMR2, EMR3, EMR4, ETL y epiglicanina.

- 10 Un polipéptido con dominio mucina también puede comprender un polipéptido no natural que tiene un dominio mucina como se define dicho término en la presente memoria. En un aspecto, el polipéptido con dominio mucina está diseñado *de novo* para comprender un dominio mucina. En un aspecto, un polipéptido con dominio mucina comprende dominios de repeticiones de aminoácidos en tandem que son ricas en Pro, Ser y Thr. En un aspecto, el número de unidades de repetición en tandem en un polipéptido con dominio mucina está entre 1 y 25. Preferiblemente, el número de unidades de repetición en tandem en un polipéptido con dominio mucina está entre 2 15 y 20. Más preferiblemente, el número de unidades de repetición en tandem en un polipéptido con dominio mucina es al menos aproximadamente 4. En un aspecto adicional, el porcentaje de restos de serina y/o treonina y prolina en un polipéptido con dominio mucina es al menos 10 %. Preferiblemente, el porcentaje de restos de serina y/o treonina y prolina en un polipéptido con dominio mucina es al menos 20 %. Más preferiblemente, el porcentaje de restos de serina y/o treonina y prolina en un polipéptido con dominio mucina es mayor que 30 %. En un aspecto final, cada 20 unidad de repetición de aminoácidos en tandem dentro del dominio mucina está compuesta por al menos 8 aminoácidos. Preferiblemente, cada unidad está compuesta por al menos 16 aminoácidos. Más preferiblemente, cada unidad está compuesta por al menos 19 aminoácidos, y cada unidad puede variar en longitud desde aproximadamente 19 aminoácidos hasta 150 aminoácidos.
- 25 En un aspecto, el polipéptido con dominio mucina comprende al menos 32 aminoácidos, que comprende al menos un 40 % de serina, treonina y prolina. En un aspecto, un polipéptido con dominio mucina comprende al menos 2, 4, 8, 10 o 12 unidades repetitivas de aminoácidos en tandem de al menos 8 aminoácidos de longitud por unidad repetitiva en tandem. Las secuencias de aminoácidos preferidas de una unidad repetitiva en tandem incluyen, pero no se limitan a, las de la Tabla I. El polipéptido con dominio mucina y/o ácidos nucleicos que codifican el polipéptido 30 con dominio mucina se pueden construir usando secuencias codificadoras del dominio mucina de proteínas que son conocidas en la técnica y están disponibles públicamente a través de fuentes como GenBank.

Tabla 1

Nombre	Secuencia de aminoácidos (nº de aa) de repetición en tandem (TR)	Número de TR/MUC*	Número de acceso <sup>+</sup>	Notas
MUC1	PAPGSTAPPAHGVTSAAPDTR (20) [SEQ ID NO: 11]	21-125; 41 y 85 son los más frecuentes	P15941	Existen múltiples variantes de MUC1
MUC2	ITTTTTTVTPPTPTGTQTPPTTTP (23) [SEQ ID NO: 12]	99	Q02817	TR principal; existen secuencias TR alternativas
MUC3 (A)	ITTTETTSHTDTPSFTSS (17) [SEQ ID NO: 13]	20	Q02505	Secuencia TR degenerada; también existe una secuencia larga rica en serina y rica en treonina
MUC4	ATPLPVTDTSASASTGH (16) [SEQ ID NO: 14]	145-395	Q99102	Secuencia TR degenerada; también existe una secuencia larga rica en serina y rica en treonina
MUC5AC	TTSTTSAP (8) [SEQ ID NO:15]	(46,17,34,58) <sup>co</sup>	P98088	Secuencia consenso T-T-S-T-T-S-A-P (SEQ ID NO: 15)
MUC5B	ATGSTATPSSTPGTTTPVLTATTPTT (29) [SEQ ID NO: 16]	(11,11,17,11,23) <sup>co</sup>	Q9HC84	Secuencia TR degenerada
MUC6	PTS	ND	Q6W4X9	NA
MUC7	TTAAPPTPSATTQAPPSSAPPE (23) [SEQ ID NO: 17]	5-6	Q8TAX7	Secuencia TR degenerada
MUC11/12	EESTTVHSSPGATGTALFP (19) [SEQ ID NO: 18]	28	Q9UKN1	Secuencia consenso E-E-S-X-X-X-H-X-X-P-X-X-T-X-T-X-X-P (SEQ ID NO:25)
MUC13	PTS	ND	Q9H3R2	
MUC14	PTS	ND		
MUC15	PTS	ND	Q8N387	
MUC16	PTS	ND	Q8WX17	
MUC17	SSSPTPAEGTSMPTSTYSEGRTPLTSMPVSTT LVATSAISLSTTPVDTSTPVTNSTEA (60) [SEQ ID NO: 19]	59-60	Q685J3	Secuencia TR degenerada
MUC19	PTS	ND	Q7Z5P9	Repeticiones de G-V-T-G-T-T-G-P-S-A (SEQ ID NO:26)
MUC20	SESSASSSDGPHPVITPSRA (19) [SEQ ID NO: 20]	11-12	Q8N307	
MUC21	ATNSESSSTVSSGIST (15) [SEQ ID NO:21]	28	Q5SSG8	Secuencia TR degenerada
MUC22	PTS	ND	E2RYF6	
TIM-1	VPPTTTT (6) [SEQ ID NO: 221]	11	Q96D42	Secuencia TR degenerada

Nombre	Secuencia de aminoácidos (nº de aa) de repetición en tandem (TR)	Número de TR/MUC*	Número de acceso <sup>†</sup>	Notas
TIM-4	PTS	ND	Q96H15	
Fractaliquina	Región tipo mucina (PTS)	ND	P78423	
Macrosialina (CD68)	Región tipo mucina (PTS)	ND	P34810	
CD96	PTS	ND	P40200	
Endosalina	Región rica en Pro	ND	Q9HCU0	
DAF (CD55)	Región rica en Pro/Thr	ND	P08174	
Podocalixina	Región rica en Thr	ND	000592	
EMR1	Región rica en Ser/Thr	ND	Q14246	
PSGL-1	QTTQPAATEA (10) [SEQ ID NO: 23]	12	Q14242	Secuencia TR degenerada

MUC8 y MUC9 se omiten; no existen datos fiables

secuencia rica en PTS prolinal/serina/treonina

\* aproximado; el número TR se expresa como un intervalo en la mayoría de los casos + Número Uniprot

∞ El número n de TR es diferente en regiones específicas

ND No descrito

En un aspecto, la longitud total de la secuencia del polipéptido con dominio mucina es de 32 a 200. Como la semivida aumentada se correlaciona con un radio hidrodinámico creciente y, lo más importante, un peso molecular aparente mayor que alrededor de 60 kD que permite eludir la filtración renal, la longitud del polipéptido con dominio mucina es algo dependiente del tamaño del resto activo. Por ejemplo, un péptido de peso molecular inferior a 5 kD, 5 puede requerir un polipéptido con dominio mucina de 200 aminoácidos para alcanzar la extensión de semivida deseada. Por el contrario, una proteína de peso molecular de 40 kD, solo puede necesitar un polipéptido con dominio mucina de 32 aminoácidos para alcanzar la semivida deseada. Además, la mucinilación permite que se optimice la semivida aumentando o reduciendo el número de repeticiones en tandem de mucina en el polipéptido con dominio mucina de la proteína de fusión.

10 Como alternativa, el resto polipeptídico con dominio mucina se proporciona como un polipéptido con dominio mucina variante que tiene una mutación en la secuencia del dominio mucina de origen natural de una proteína de tipo silvestre. Por ejemplo, el polipéptido con dominio mucina variante comprende sitios de glicosilación unidos a O adicionales en comparación con el polipéptido con dominio mucina de tipo silvestre. Como alternativa, el polipéptido con dominio mucina variante comprende mutaciones en la secuencia de aminoácidos que dan como resultado un número incrementado de restos de serina, treonina o prolina en comparación con un polipéptido con dominio mucina de tipo silvestre. Como alternativa, las secuencias de polipéptido con dominio mucina variantes comprenden restos que añaden o restan carga, que incluyen pero no se limitan a ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, histidina y arginina, que cambian el pI o la carga de la molécula a un pH particular.

20 Proteína activa y proteína activa terapéutica

Como se usa en la presente memoria, una "proteína activa" para su inclusión en la proteína de fusión divulgada en la 25 presente memoria significa una proteína de interés o función biológica, terapéutica, profiláctica o de diagnóstico y/o es capaz de mediar en una actividad biológica. Una "proteína activa terapéutica" como se usa esta expresión en la presente memoria es una proteína que es capaz de prevenir o mejorar una enfermedad, trastorno o afección cuando se administra a un sujeto.

30 En un aspecto, una proteína activa o proteína activa terapéutica de acuerdo con la invención excluye específicamente moléculas de inmunoglobulina o cualquiera que contenga un dominio Fc, o cualquier fragmento de la misma.

35 De particular interés son las proteínas activas y las proteínas terapéuticas activas para las cuales se busca un aumento en un parámetro farmacocinético, una mayor solubilidad, una mayor estabilidad o alguna otra propiedad farmacéutica mejorada, o aquellas proteínas activas para las cuales aumentar la semivida mejoraría la eficacia y la 40 seguridad o que darían como resultado reducir la frecuencia de administración y/o mejorar el cumplimiento del paciente. Por lo tanto, las proteínas de fusión se preparan con diversos objetivos en mente, que incluyen mejorar la eficacia terapéutica de la proteína activa terapéutica, por ejemplo, aumentar la exposición *in vivo* o el período de tiempo que la proteína de fusión de la invención permanece dentro de la ventana terapéutica cuando se administra a un sujeto, en comparación con una proteína activa no unida al polipéptido con dominio mucina.

45 En un aspecto, una proteína de fusión de la invención puede comprender una única proteína activa unida a un polipéptido con dominio mucina (como se describe más completamente a continuación). En otro aspecto, la proteína de fusión puede comprender una primera proteína activa y una segunda molécula de la misma proteína activa, dando como resultado una proteína de fusión que comprende las dos proteínas activas unidas a través de uno o más polipéptidos del dominio mucina. En otro aspecto, la proteína de fusión puede comprender una primera proteína activa y una segunda proteína activa distinta, dando como resultado una proteína de fusión que comprende las dos proteínas activas con actividades diferentes unidas a través de uno o más polipéptidos con dominio mucina.

50 En un aspecto, una proteína activa exhibirá una especificidad de unión a una diana dada u otra característica biológica deseada cuando se use *in vivo* o cuando se utilice en un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, la proteína activa puede ser un agonista, un receptor, un ligando, un antagonista, una enzima o una hormona. De particular interés son las proteínas activas usadas o que se sabe que son útiles para una enfermedad o trastorno en el que una prolongación en su semivida permitiría una administración menos frecuente o un efecto farmacológico potenciado. 55 También son de interés las proteínas activas que tienen una estrecha ventana terapéutica entre la dosis efectiva mínima o la concentración en sangre ( $C_{\min}$ ) y la dosis máxima tolerada o la concentración sanguínea ( $C_{\max}$ ). En tales casos, la unión de la proteína activa a una proteína de fusión que comprende un polipéptido con dominio mucina puede producir una mejora en estas propiedades, haciéndolas más útiles como agentes terapéuticos o preventivos en comparación con la proteína activa no unida al polipéptido con dominio mucina.

60 Las proteínas activas que son proteínas terapéuticas activas pueden tener utilidad en el tratamiento en diversas categorías terapéuticas o de enfermedades, que incluyen pero no se limitan a: trastornos de la glucosa y la insulina, trastornos metabólicos, enfermedades cardiovasculares, trastornos de la coagulación/hemorragia, trastornos o afecciones del crecimiento, afecciones tumorigénicas, afecciones inflamatorias, afecciones autoinmunitarias y otras enfermedades y categorías de enfermedad en las que una proteína o péptido terapéutico no unido a un polipéptido con dominio mucina exhibe una semivida subóptima, o en el que no existe una proteína o péptido terapéutico.

Una proteína activa puede ser una proteína nativa de longitud completa o puede ser un fragmento o una variante de secuencia de una proteína activa que retiene al menos una parte de la actividad terapéutica de la proteína activa nativa. En una realización, las proteínas activas de acuerdo con la invención pueden ser un polipéptido recombinante con una secuencia correspondiente a una proteína existente en la naturaleza. En otra realización, las proteínas activas pueden ser variantes de secuencia, fragmentos, homólogos e imitadores de una secuencia natural que retienen al menos una porción de la actividad biológica de la proteína activa nativa.

En ejemplos no limitantes, la proteína activa puede ser una secuencia que presenta al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia, o alternativamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la proteína activa nativa o una variante de una proteína activa nativa. Dichas proteínas y péptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: péptidos bioactivos (tales como GLP-1, exendina-4, oxitocina, péptidos opioáceos), citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, linfocinas, ligandos, receptores, hormonas, enzimas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de dominio, nanoanticuerpos, anticuerpos monocatenarios, 'andamios alternativos' de anticuerpos modificados genéticamente tales como DARPins, cennitinas, adnectinas y factores de crecimiento. Los ejemplos de receptores incluyen el dominio extracelular de receptores asociados a la membrana (tales como TNFR2, receptores de VEGF, IL-1R1, IL-1RAcP, receptor de IL-4, receptor de hGH, CTLA-4, PD-1, IL-6Ra, receptores de FGF), receptores solubles que se han escindido de sus dominios transmembrana, receptores 'simulados' o 'señuelos' (tales como IL-1RII, TNFRSF11B, DcR3) y cualquier receptor soluble modificado químicamente o genéticamente. Los ejemplos de enzimas incluyen proteína C activada, factor VII, colagenasa; agalsidasa-beta; domase-alfa; alteplasa; asparaginasa pegilada; asparaginasa e imiglucerasa. Los ejemplos de polipéptidos o proteínas específicos incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de las colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de las colonias (CSF), interferón beta (IFN-β), interferón gamma (IFNγ), factor inductor del interferón gamma I (IGIF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), RANTES (regulado tras la activación, linfocitos T normales expresados y presuntamente secretados), proteínas inflamatorias de macrófagos (p. ej., MIP-1-α y MIP-1-β, factor de iniciación de la elongación de *Leishmania* (LEIF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-2 (NT-2), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), neurotrofina-5 (NT-5), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), receptor tipo II del TNF, eritropoyetina (EPO), insulina y glicoproteínas solubles, por ejemplo, glicoproteínas gp120 y gp160. La glicoproteína gp120 es una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y la glicoproteína gp160 es un precursor conocido de la glicoproteína gp120.

En un aspecto, el polipéptido biológicamente activo es GLP-1. En otro aspecto, el polipéptido biológicamente activo es nesiritida, péptido natriurético de tipo B humano (hBNP). En otro aspecto más, el polipéptido biológicamente activo es la secretina, que es una hormona peptídica compuesta por una secuencia de aminoácidos idéntica a la secretina porcina que se produce de manera natural que consiste en 27 aminoácidos. En un aspecto, el polipéptido biológicamente activo es enfuvirtida, un polipéptido sintético lineal de 36 aminoácidos que es un inhibidor de la fusión de VIH-1 con linfocitos CD4+. En un aspecto, el polipéptido biológicamente activo es bivalirudina, un inhibidor de trombina directo específico y reversible. El factor antihemofílico (AHF) puede seleccionarse como el polipéptido activo. Se sabe que la semivida media *in vivo* de HEMOFIL MTM AHF es de 14,7 ± 5,1 horas (n = 61). En otro aspecto, la eritropoyetina es el polipéptido biológicamente activo. La eritropoyetina es una glicoproteína de 165 aminoácidos fabricada mediante tecnología de ADN recombinante y tiene los mismos efectos biológicos que la eritropoyetina endógena. En pacientes adultos y pediátricos con insuficiencia renal crónica, se sabe que la semivida de eliminación de la eritropoyetina plasmática no modificada después de la administración intravenosa oscila entre 4 y 13 horas. En otro aspecto más, el polipéptido biológicamente activo es reteplasa. La reteplasa es una muteína de deleción no glicosilada del activador del plasminógeno tisular (tPA), que comprende el kringle 2 y los dominios de proteasa del tPA humano. En base a la medición de la actividad trombolítica, se sabe que la semivida efectiva de la reteplasa no modificada es de aproximadamente 15 minutos.

En una realización preferida, el polipéptido activo es anakinra, una forma recombinante, no glicosilada del antagonista del receptor de interleucina-1 humano o la forma glicosilada expresada en células de mamífero (IL-1Ra). En un caso, anakinra consiste en 153 aminoácidos y tiene un peso molecular de 17,3 kilodalton. Puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante utilizando un sistema de expresión bacteriana en *E. coli*. La versión glicosilada de IL-1Ra puede producirse en sistemas de expresión de mamíferos. Se sabe que la semivida *in vivo* de anakinra no modificada varía de 4 a 6 horas.

En otra realización preferida, el polipéptido activo es exendina-4. En un caso, la exendina-4 consiste en 39 aminoácidos. Puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante utilizando un sistema de expresión bacteriana en *E. coli*. Se sabe que la semivida no modificada *in vivo* de la exendina-4 es de 0,5 horas iv. [Ai, G., et al.; Pharmacokinetics of exendin-4 in Wistar rats; Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences; 17 (2008) 6-10].

- La becaplermina también se puede seleccionar como el polipéptido activo. Bcaplermina es un factor de crecimiento recombinante derivado de plaquetas humanas (rhPDGF-BB) para administración tópica. La becaplermina puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante mediante la inserción del gen de la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Una forma de becaplermina tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kD y es un homodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. El polipéptido activo puede ser oprelvequina, que es una forma recombinante de la interleucina once (IL-11) que se produce en *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante tecnología de ADN recombinante. En un aspecto, el polipéptido biológicamente activo seleccionado tiene una masa molecular de aproximadamente 19.000 dalton y no está glicosilado. El polipéptido tiene 177 aminoácidos de longitud y difiere de la longitud de 178 aminoácidos de la IL-11 nativa solo en que carece del resto de prolina amino-terminal, que se sabe que no da como resultado diferencias medibles en la bioactividad ni *in vitro* ni *in vivo*. Se sabe que la semivida terminal de la oprelvequina sin modificar es de aproximadamente 7 h. Otro polipéptido biológicamente activo puede ser glucagón, una hormona polipeptídica idéntica al glucagón humano que aumenta la glucosa en sangre y relaja los músculos lisos del tracto gastrointestinal. El glucagón se puede sintetizar en una cepa de laboratorio especial no patógena de la bacteria *E. coli* que ha sido genéticamente alterada por la adición del gen para el glucagón. En un aspecto específico, el glucagón es un polipéptido monocatenario que contiene 29 restos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 3.483. Se sabe que la semivida *in vivo* es corta, oscilando entre 8 y 18 minutos.
- El G-CSF también se puede elegir como el polipéptido activo. El factor estimulante de colonias de granulocitos recombinantes o G-CSF se usa después de varios tratamientos de quimioterapia para estimular la recuperación de glóbulos blancos. La semivida descrita de G-CSF recombinante es solo de 3,5 horas.
- En un aspecto, el polipéptido biológicamente activo puede ser interferón alfa (IFN alfa). Químicamente, el interferón alfa 2a modificado con PEG está clínicamente validado para el tratamiento de la hepatitis C. Esta proteína PEGilada requiere inyección semanal y son deseables formulaciones de liberación lenta con una semivida más prolongada.
- Las proteínas celulares adicionales incluyen, pero no están limitadas a: VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, Her-1, Her-2, Her-3, EGF-1, EGF-2, EGF-3, Alfa3, cMet, ICOS, CD40L, LFA-1, c-Met, ICOS, LFA-1, IL-6, B7.1, B7.2, OX40, IL-1b, TACI, IgE, BAFF, o BLys, TPO-R, CD19, CD20, CD22, CD33, CD28, IL-1-R1, TNF $\alpha$ , TRAIL-R1, Receptor del complemento 1, FGFa, Osteopontina, Vitronectina, Efrina A1-A5, Efrina B1-B3, alfa-2-macroglobulina, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CXCL16, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, PDGF, TGF $\beta$ , GMCSF, SCF, p40 (IL12/IL23), IL1b, IL1a, IL1ra, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL15, IL23, Fas, FasL, ligando de Flt3, 41BB, ACE, ACE-2, KGF, FGF-7, SCF, Netrina1,2, IFNa,b,g, Caspasa-2,3,7,8,10, ADAM S1,S5,8,9,15,TS1,TS5; Adiponectina, ALCAM, ALK-1, APRIL, Anexina V, Angiogenina, Anfiregulina, Angiopoyetina-1,2,4, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1, B7-H2, B7-H3, Bc1-2, BACE-1, BAK, BCAM, BDNF, bNGF, bECGF, BMP2,3,4,5,6,7,8; CRP, Cadherina-6,8,11; Catepsina A, B, C, D, E, L, S, V, X; CD11a/LFA-1, LFA-3, GP2b3a, receptor de GH, proteína F del RSV, IL-23 (p40, p19), IL-12, CD80, CD86, CD28, CTLA-4, a4P1, a4137, TNF/Linfotoxina, IgE, CD3, CD20, IL-6, IL-6R, BLYS/BAFF, IL-2R, HER2, EGFR, CD33, CD52, Digoxina, Rho (D), Varicela, Hepatitis, CMV, Tétano, Vacuna, Antiveneno, Botulínica, Trail-R1, Trail-R2, cMet, familia del TNF-R, tal como LA NGF-R, CD27, CD30, CD40, CD95, receptor de la linfotoxina a/b, Wsl-1, TL1A/TNFSF15, BAFF, BAFF-R/TNFRSF13C, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R2/TNFRSF10B, Fas/TNFRSF6 CD27/TNFRSF7, DR3/TNFRSF25, HVEM/TNFRSF14, TROY/TNFRSF19, Ligando de CD40/TNFSF5, BCMA/TNFRSF17, CD30/TNFRSF8, LIGHT/TNFSF14, 4-1BB/TNFRSF9, CD40/TNFRSF5, GITR/TNFRSF18, Osteoprotegerina/TNFRSF11B, RANK/TNFRSF11A, TRAIL R3/TNFRSF10C, TRAIL/TNFSF10, TRANCE/RANK L/TNFSF11, Ligando de 4-1BB/TNFSF9, TWEAK/TNFSF12, Ligando de CD40/TNTSFS, Ligando de Fas/TNFSF6, RELT/TNFRSF19L, APRIL/TNFSF13, DcR3/TNFRSF6B, TNF R1/TNFRSF1A, TRAIL R1/TNFRSF10A, TRAIL R4/TNFRSF10D, Ligando de CD30/TNFSF8, Ligando de GITR/TNFSF18, TNFSF18, TACI/TNFRSF13B, NGF R/TNFRSF16, Ligando de OX40/TNFSF4, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R3/TNFRSF10C, TWEAK R/TNFRSF12, BAFF/BLYS/TNFSF13, DR6/TNFRSF21, TNF-alfa/TNFSF1A, Pro-TNF-alfa/TNFSF1A, Linfotoxina beta R/TNFRSF3, Quimera Linfotoxina beta R (LTbR)/Fc, TNF R1/TNFRSF1A, TNF-beta/TNFSF1B, PGRP-S, TNF R1/TNFRSF1A, TNF RII/TNFRSF1B, EDA-A2, TNF-alfa/TNFSF1A, EDAR, XEDAR, TNF RI/TNFRSF1A 4EBP1, 14-3-3 zeta, 53BPI, 2B4/SLAMF4, CCL21/6Cina, 4-1BB/TNFRSF9, 8D6A, Ligando de 4-1BB/TNFSF9,8-oxo-dG, 4-Amino-1,8-naftalimida, A2B5, Aminopeptidasa LRAP/ERAP2, A33, Aminopeptidasa N/ANPEP, Aag, Aminopeptidasa P2/XPNPEP2, ABCG2, Aminopeptidasa P1/XPNPEP1, ACE, Aminopeptidasa PILS/ARTS1, ACE-2, Amnionless, Actina, Anfiregulina, beta-Actina, AMPK alfa 1/2, Activina A, AMPK alfa 1, Activina AB, AMPK alfa 2, Activina B, AMPK beta 1, Activina C, AMPK beta 2, Activina RIA/ALK-2, Andrógeno R/NR3C4, Activina RIB/ALK-4, Angiogenina, Activina RIIA, Angiopoyetina-1, Activina RIIIB, Angiopoyetina-2, ADAMS, Angiopoyetina-3, ADAM9, Angiopoyetina-4, ADAM10, Angiopoyetina-tipo 1, ADAM12, Angiopoyetina-tipo 2, ADAM15, Angiopoyetina-tipo 3, TACE/ADAM17, Angiopoyetina-tipo 4, ADAM19, Angiopoyetina-tipo 7/CDT6, ADAM33, Angioestatina, ADAMTS4, Anexina Al/Anexina I, ADAMTSS, Anexina A7, ADAMTS1, Anexina A10, ADAMTSL-1/Punctina, Anexina V, Adiponectina/Acrp30, ANP, AEBSF, Sitio AP, Agrecano, APAF-1, Agrina, APC, AgRP, APE, AGTR-2, APT, AIF, APLP-1, Akt, APLP-2, Akt1, Apolipoproteína AI, Akt2, Apolipoproteína B, Akt3, APP, Suelo, Albúmina, APRIL/TNFSF13, ALCAM, ARC, ALK-1, Artemina, ALK-7, Arilsulfatasa A/ARSA, Fosfatasa alcalina, ASAII2/N-acilesfingosina amidohidrolasa-2, alfa 2u-Globulin, ASC, alfa-1-Glucoproteína ácida, ASGR1, alfa-Fetoproteína, ASK1, ALS, ATM, Ameloblastina, ATRIP, AMICA/JAML, Aurora A, AMIGO, Aurora B, AMIGO2,

Axina-1, AMIGO3, Ax1, Aminoacilasa/ACY1, Azurocidina/CAP37/HBP, Aminopeptidasa A/ENPEP, B4GALT1, BIM, B7-1/CD80, 6-Biotina-17-NAD, B7-2/CD86, BLAME/SLAMF8, B7-H1/PD-L1, CXCL13/BLC/BCA-1, B7-H2, BLIMP1, B7-H3, Blk, B7-H4, BMI-1, BACE-1, BMP-1/PCP, BACE-2, BMP-2, Bad, BMP-3, BAFF/TNFSF13B, BMP-3b/GDF-10, BAFF R/TNFRSF13C, BMP-4, Bag-1, BMP-5, BAK, BMP-6, BAMBI/NMA, BMP-7, BARD1, BMP-8, Bax, BMP-9, BCAM, BMP-10, Bc1-10, BMP-15/GDF-9B, Bc1-2, BMPR-IA/ALK-3, proteína A1 relacionada con Bc1-2, BMPR-IB/ALK-6, Bc1-w, BMPR-II, Bc1-x, BNIP3L, Bc1-xL, BOC, BCMA/TNFRSF17, BOK, BDNF, BPDE, Benzamida, Brachury, Cadena beta común, B-Raf, beta IG-H3, CXCL14/BRAK, Betacelulina, BRCA1, beta-Defensina 2, BRCA2, BID, BTLA, Biglicano, Bub-1, Proteína citolítica tipo Bik, c-jun, CD90/Thy1, c-Rel, CD94, CCL6/C10, CD97, Clq R1/CD93, CD151, C1qTNF1, CD160, C1qTNF4, CD163, C1qTNF5, CD164, Componente del complemento C1r, CD200, Componente del complemento C1s, CD200 R1, Componente del complemento C2, CD229/SLAMF3, Componente del complemento C3a, CD23/Fc epsilon RII, Componente del complemento C3d, CD2F-10/SLAMF9, Componente del complemento CSa, CDSL, Cadherina-4/R-Cadherina, CD69, Cadherina-6, CDC2, Cadherina-8, CDC25A, Cadherina-11, CDC25B, Cadherina-12, CDCP1, Cadherina-13, CDO, Cadherina-17, CDX4, E-Cadherina, CEACAM-1/CD66a, N-Cadherina, CEACAM-6, P-Cadherina, Cerberus 1, VE-Cadherina, CFTR, Calbindina D, cGMP, Calcineurina A, Chem R23, Calcineurina B, Quemerina, Calreticulina-2, Chemokine Sampler Packs, CaM Cinasa II, Quitinasa 3-tipo 1, AMPc, Quitotriosidasa/CHTT1, Canabinoide R1, Chk1, Canabinoide R2/CB2/CNR2, Chk2, CAR/NR113, CHL-1/L1CAM-2, Anhidrasa carbónica I, Colinacetiltransferasa/ChAT, Anhidrasa carbónica II, Condrolectina, Anhidrasa carbónica III, Cordina, Anhidrasa carbónica IV, Cordina tipo 1, Anhidrasa carbónica Va, Cordina-tipo 2, Anhidrasa carbónica VB, CINC-1, Anhidrasa carbónica VI, CINC-2, Anhidrasa carbónica VII, CINC-3, Anhidrasa carbónica VIII, Claspsina, Anhidrasa carbónica IX, Claudina-6, Anhidrasa carbónica X, CLC, Anhidrasa carbónica XII, CLEC-1, Anhidrasa carbónica XIII, CLEC-2, Anhidrasa carbónica XIV, CLECSF13/CLEC4F, Carboximetil lisina, CLECSF8, Carboxipeptidasa A1/CPA1, CLF-1, Carboxipeptidasa A2, CL-P1/COLEC12, Carboxipeptidasa A4, Clusterina, Carboxipeptidasa B1, Clusterina tipo 1, Carboxipeptidasa E/CPE, CMG-2, Carboxipeptidasa X1, CMV UL146, Cardiotrofina-1, CMV UL147, Carnosina dipeptidasa 1, CNP, Caronte, CNTF, CART, CNTF R alfa, Caspasa, Factor de coagulación II/Trombina, Caspasa-1, Factor de coagulación III/Factor tisular, Caspasa-2, Factor de coagulación VII, Caspasa-3, Factor de coagulación X, Caspasa-4, Factor de coagulación XI, Caspasa-6, Factor de coagulación XIV/Proteína C, Caspasa-7, COCO, Caspasa-8, Cohesina, Caspasa-9, Colágeno I, Caspasa-10, Colágeno II, Caspasa-12, Colágeno IV, Caspasa-13, Cadena gamma común/IL-2 R gamma, Inhibidores peptídicos de caspasas, COMP/Tromboespondina-5, Catalasa, Componente del complemento C1rLP, beta-Catenina, Componente del complemento ClqA, Catepsina 1, Componente del complemento C1qC, Catepsina 3, Factor del complemento D, Catepsina 6, Factor del complemento I, Catepsina A, Complemento MASP3, Catepsina B, Conexina 43, Catepsina C/DPPI, Contactina-1, Catepsina D, Contactina-2/TAG1, Catepsina E, Contactina-4, Catepsina F, Contactina-5, Catepsina H, Corina, Catepsina L, Cornulina, Catepsina O, CORS26/C1qTNF, 3, Catepsina S, Células madre corticales de rata, Catepsina V, Cortisol, Catepsina X/Z/P, COUP-TF I/NR2F1, CBP, COUP-TF II/NR2F2, CCI, COX-1, CCK-A R, COX-2, CCL28, CRACC/SLAMF7, CCR1, Proteína C reactiva, CCR2, Creatina cinasa, Músculo/CKMM, CCR3, Creatinina, CCR4, CREB, CCR5, CREG, CCR6, CRELD1, CCR7, CRELD2, CCR8, CRHBP, CCR9, CRHR-1, CCR10, CRIM1, CD155/PVR, Cripto, CD2, CRISP-2, CD3, CRISP-3, CD4, Crossveinless-2, CD4+/45RA-, CRTAM, CD4+/45RO-, CRTB-2, CD4+/CD62L-/CD44, CRY1, CD4+/CD62L+/CD44, Cryptic, CD5, CSB/ERCC6, CD6, CCL27/CTACK, CD8, CTGF/CCN<sup>2</sup>, CD8+/45RA-, CTLA-4, CD8+/45RO-, Cubilina, CD9, CX3CR1, CD14, CXADR, CD27/TNFRSF7, CXCL16, Ligando de CD27/TNFSF7, CXCR3, CD28, CXCR4, CD30/TNFRSF8, CXCR5, Ligando de CD30/TNFSF8, CXCR6, CD31/PECAM-1, Ciclofilina A, CD34, Cyr61/CCN1, CD36/SR-B3, Cistatina A, CD38, Cistatina B, CD40/TNFRSF5, Cistatina C, Ligando de CD40/TNFSF5, Cistatina D, CD43, Cistatina E/M, CD44, Cistatina F, CD45, Cistatina H, CD46, Cistatina H2, CD47, Cistatina S, CD48/SLAMF2, Cistatina SA, CD55/DAF, Cistatina SN, CD58/LFA-3, Citocromo c, CD59, Apocitocromo c, CD68, Holocitocromo c, CD72, Citoqueratina 8, CD74, Citoqueratina 14, CD83, Citoqueratina 19, CD84/SLAMF5, Citonina, D6, DISP1, DAN, Dkk-1, DANCE, Dkk-2, DARPP-32, Dkk-3, DAX1/NROB1, Dkk-4, DCC, DLEC, DCIR/CLEC4A, DLL1, DCAR, DLL4, DcR3/TNFRSF6B, d-Luciferina, DC-SIGN, ADN Ligasa IV, DC-SIGNR/CD299, ADN polimerasa beta, DcTRAIL R1/TNFRSF23, DNAM-1, DcTRAIL R2/TNFRSF22, DNA-PKcs, DDR1, DNER, DDR2, Dopa Decarboxilasa/DDC, DEC-205, DPCR-1, Decapentaplégica, DPP6, Decorina, DPPA4, Dectina-1/CLEC7A, DPPA5/ESG1, Dectina-2/CLEC6A, DPPII/QPP/DPP7, DEP-1/CD148, DPPIV/CD26, Desert Hedgehog, DR3/TNFRSF25, Desmina, DR6/TNFRSF21, Desmogleína-1, DSCAM, Desmogleína-2, DSCAM-L1, Desmogleína-3, DSPG3, Dishevelled-1, Dtk, Dishevelled-3, Dinamina, EAR2/NR2F6, EphA5, ECE-1, EphA6, ECE-2, EphA7, ECF-L/CHI3L3, EphA8, ECM-1, EphB1, Ecotina, EphB2, EDA, EphB3, EDA-A2, EphB4, EDAR, EphB6, EDG-1, Efrina, EDG-5, Efrina-A1, EDG-8, Efrina-A2, eEF-2, Efrina-A3, EGF, Efrina-A4, EGF R, Efrina-A5, EGR1, Efrina-B, EG-VEGF/PK1, Efrina-B1, eIF2 alfa, Efrina-B2, eIF4E, Efrina-B3, E1k-1, Epigen, EMAP-II, Epimorfina/Sintaxina 2, EMMPRIN/CD147, Epirregulina, CXCL5/ENA, Receptor EPR-1/Xa, Endocan, ErbB2, Endoglin/CD105, ErbB3, Endogluccano, ErbB4, Endonucleasa III, ERCC1, Endonucleasa IV, ERCC3, Endonucleasa V, ERK1/ERK2, Endonucleasa VIII, ERK1, Endorepelina/Perlecan, ERK2, Endostatina, ERK3, Endotelina-1, ERK5/BMK1, Engrailed-2, ERR alfa/NR3B1, EN-RAGE, ERR beta/NR3B2, Enteropeptidasa/Enterocinasa, ERR gamma/NR3B3, CCL11/Eotaxina, Eritropoyetina, CCL24/Eotaxina-2, Eritropoyetina R, CCL26/Eotaxina-3, ESAM, EpCAM/TROP-1, ER alfa/NR3A1, EPCR, ER beta/NR3A2, Eph, Exonucleasa III, EphA1, Exostosina tipo 2/EXTL2, EphA2, Exostosina tipo 3/EXTL3, EphA3, FABP1, FGF-BP, FABP2, FGF R1-4, FABP3, FGF R1, FABP4, FGF R2, FABP5, FGF R3, FABP7, FGF R4, FABP9, FGF R5, Factor del complemento B, Fgr, FADD, FHR5, FAM3A, Fibronectina, FAM3B, Ficolin-2, FAM3C, Ficolina-3, FAM3D, FITC, Proteína de activación de fibroblastos alfa/FAP, FKBP38, Fas/TNFRSF6, Flap, Ligando Fas/TNFSF6, FLIP, FATP1, FLRG, FATP4, FLRT1, FATP5, FLRT2, Fc gamma R1/CD64, FLRT3, Fc gamma RIIB/CD32b, Flt-3, Fc gamma

RIIC/CD32c, Ligando Flt-3, Fc gamma RIIA/CD32a, Foleistatina, Fc gamma RIII/CD16, Foleistatina tipo 1, FcRH1/IRTA5, FosB/G0S3, FcRH2/IRTA4, FoxD3, FcRH4/IRTA1, FoxJ1, FcRH5/IRTA2, FoxP3, Receptor de Fc tipo 3/CD16-2, Fpg, FEN-1, FPR1, Fetuña A, FPRL1, Fetuña B, FPRL2, FGF ácido, CX3CL1/Fractalquina, FGF básico, Frizzled-1, FGF-3, Frizzled-2, FGF-4, Frizzled-3, FGF-5, Frizzled-4, FGF-5, Frizzled-5, FGF-8, Frizzled-6, FGF-9, Frizzled-7, FGF-10, Frizzled-8, FGF-11, Frizzled-9, FGF-12, Frk, FGF-13, sFRP-1, FGF-16, sFRP-2, FGF-17, sFRP-3, FGF-19, sFRP-4, FGF-20, Furina, FGF-21, FXR/NR1H4, FGF-22, Fyn, FGF-23, G9a/EHMT2, GFR alfa-3/GDNF R alfa-3, GABA-A-R alfa 1, GFR alfa-4/GDNF R alfa-4, GABA-A-R alfa 2, GITR/TNFRSF18, GABA-A-R alfa 4, Ligando de GITR/TNFSF18, GABA-A-R alfa 5, GLI-1, GABA-A-R alfa 6, GLI-2, GABA-A-R beta 1, GLP/EHMT1, GABA-A-R beta 2, GLP-1 R, GABA-A-R beta 3, Glucagón, GABA-A-R gamma 2, Glucosamina (N-acetil)-6-Sulfatasa/GNS, GABA-B-R2, GluR1, GAD1/GAD67, GluR2/3, GAD2/GAD65, GluR2, GADD45 alfa, GluR3, GADD45 beta, Glut1, GADD45 gamma, Glut2, Galectina-1, Glut3, Galectina-2, Glut4, Galectina-3, GlutS, Galectina-3 BP, Glutarredoxina 1, Galectina-4, Glicina R, Galectina-7, Glicoforina A, Galectina-8, Glipicano 2, Galectina-9, Glipicano 3, GaINAc4S-65T, Glipicano 5, GAP-43, Glipicano 6, GAPDH, GM-CSF, Gas1, GM-CSF R alfa, Gas6, GMF-beta, GASF-1/WFIKNRP, gp130, GASP-2/WFIKN, Glicógeno fosforilasa BB/GPBB, GATA-1, GPR15, GATA-2, GPR39, GATA-3, GPVI, GATA-4, GR/NR3C1, GATA-5, Gr-1/Ly-6G, GATA-6, Granulisina, GBL, Granzima A, GCNF/NR6A1, Granzima B, CXCL6/GCP-2, Granzima D, G-CSF, Granzima G, G-CSF R, Granzima H, GDF-1, GRASP, GDF-3 GRB2, GDF-5, Gremlina, GDF-6, GRO, GDF-7, CXCL1/GRO alfa, GDF-8, CXCL2/GRO beta, GDF-9, CXCL3/GRO gamma, Hormona del crecimiento GDF-11, Hormona del crecimiento GDF-15, Hormona del crecimiento R, GDNF, GRP75/HSPA9B, GFAP, GSK-3 alfa/beta, GFI-1, GSK-3 alfa, GFR alfa-1/GDNF R alfa-1, GSK-3 beta, GFR alfa-2/GDNF R alfa-2, EGN1T, H2AX, Histidina, H60, HM74A, HAI-1, HMGA2, HAI-2, HMGB1, HAI-2A, TCF-2/HNF-1 beta, HAI-2B, HNF-3 beta/FoxA2, HAND1, HNF-4 alfa/NR2A1, HAPLN1, HNF-4 gamma/NR2A2, Proteasa de tipo tripsina de las vías respiratorias/HAT, HO-1/HMOX1/HSP32, HB-EGF, HO-2/HMOX2, CCL14a/HCC-1, HPRG, CCL14b/HCC-3, Hrk, CCL16/HCC-4, HRP-1, alfa HCG, HS6ST2, Hck, HSD-1, HCR/CRAM-A/B, HSD-2, HDGF, HSP10/EPF, Hemoglobina, HSP27, Hepasocina, HSP60, HES-1, HSP70, HES-4, HSP90, HGF, HTRA/Proteasa Do, Activador de HGF, HTRA1/PRSS11, HGF R, HTRA2/Omi, HIF-1 alfa, HVEM/TNFRSF14, HIF-2 alfa, Hialuronano, HIN-1/Secretoglobulina 3A1,4-Hidroxinonenal, Hip, CCL1/1-309/TCA-3, IL-10, cIAP (pan), IL-10 R alfa, cIAP-1/HIAP-2, IL-10 R beta, cIAP-2/HIAP-1, IL-11, IBSP/Sialoproteína II, IL-11 R alfa, ICAM-1/CD54, IL-12, ICAM-2/CD102, IL-12/IL-23 p40, ICAM-3/CD50, IL-12 R beta 1, ICAM-5, IL-12 R beta 2, ICAT, IL-13, ICOS, IL-13 R alfa 1, Iduronato 2-Sulfatasa/IDS, IL-13 R alfa 2, IFN, IL-15, IFN-alfa, IL-15 R alfa, IFN-alfa 1, IL-16, IFN-alfa 2, IL-17, IFN-alfa 4b, IL-17 R, IFN-alfa A, IL-17 RCC, IFN-alfa B2, IL-17 RD, IFN-alfa C, IL-17B, IFN-alfa D, IL-17B R, IFN-alfa F, IL-17C, IFN-alfa G, IL-17D, IFN-alfa H2, IL-17E, IFN-alfa I, IL-17F, IFN-alfa J1, IL-18/IL-1F4, IFN-alfa K, IL-18 BPa, IFN-alfa WA, IL-18 BPC, IFN-alfa/beta R1, IL-18 BPd, IFN-alfa/beta R2, IL-18 R alfa/IL-1 R5, IFN-beta, IL-18 R beta/IL-1 R7, IFN-gamma, IL-19, IFN-gamma R1, IL-20, IFN-gamma R2, IL-20 R alfa, IFN-omega, IL-20 R beta, IgE, IL-21, IGFBP-1, IL-21 R, IGFBP-2, IL-22, IGFBF-3, IL-22 R, IGFBP-4, IL-22BP, IGFBP-5, IL-23, IGFBP-6, IL-23 R, IGFBP-L1, IL-24, IGFBP-rp1/IGFBP-7, IL-26/AK155, IGFBP-rP10, IL-27, IGF-I, IL-28A, IGF-IR, IL-28B, IGF-II, IL-29/IFN-lambda 1, IGF-II R, IL-31, IgG, IL-31 RA, IgM, IL-32 alfa, IGSF2, IL-33, IGSF4A/SynCAM, ILT2/CD85j, IGSF4B, ILT3/CD85k, IGSF8, ILT4/CD85d, IgY, ILT5/CD85a, Ikb-beta, ILT6/CD85e, IKK alfa, Indian Hedgehog, IKK epsilon, INSRR, IKK gamma, Insulina, IL-1 alfa/IL-1F1, Insulina R/CD220, IL-1 beta/IL-1F2, Proinsulina, IL-1ra/IL-1F3, Insulinsina/IDE, IL-1F5/FIL1 delta, Integrina alfa 2/CD49b, IL-1F6/FIL1 epsilon, Integrina alfa 3/CD49c, IL-1F7/FIL1 zeta, Integrina alfa 3 beta 1/VLA-3, IL-1F8/FIL1 eta, Integrina alfa 4/CD49d, IL-1F9/IL-1H1, Integrina alfa 5/CD49e, IL-1F10/IL-1H2, Integrina alfa 5 beta 1, IL-1 R1, Integrina alfa 6/CD49f, IL-1 RII, Integrina alfa 7, IL-1 R3/IL-1 R AcP, Integrina alfa 9, IL-1 R4/ST2, Integrina alfa E/CD103, IL-1 R6/IL-1 R rp2, Integrina alfa L/CD11a, IL-1 R8, Integrina alfa L beta 2, IL-1 R9, Integrina alfa M/CD11b, IL-2, Integrina alfa M beta 2, IL-2 R alfa, Integrina alfa V/CD51, IL-2 R beta, Integrina alfa V beta 5, IL-3, Integrina alfa V beta 3, IL-3 R alfa, Integrina alfa V beta 6, IL-3 R beta, Integrina alfa X/CD11c, IL-4, Integrina beta 1/CD29, IL-4 R, Integrina beta 2/CD18, IL-5, Integrina beta 3/CD61, IL-5 R alfa, Integrina beta 5, IL-6, Integrina beta 6, IL-6 R, Integrina beta 7, IL-7, CXCL10/IP-10/CRG-2, IL-7 R alfa/CD127, IRAK1, CXCR1/IL-8 RA, IRAK4, CXCR2/IL-8 RB, IRS-1, CXCL8/IL-8, Islet-1, IL-9, CXCL11/1-TAC, IL-9 R, Jagged 1, JAM-4/IGSFS, Jagged 2, JNK, JAM-A, JNK1/JNK2, JAM-B/VE-JAM, JNK1, JAM-C, JNK2, Cininógeno, Calicreína, 3/PSA, Cininoestatina, Calicreína 4, KIR/CD158, Calicreína 5, KIR2DL1, Calicreína 6/Neurosina, KIR2DL3, Calicreína 7, KIR2DL4/CD158d, Calicreína 8/Neuropsina, KIR2DS4, Calicreína 9, KIR3DL1, Calicreína plasmática-KLK1, KJR3DL2, Calicreína 10, Kirrel2, Calicreína 11, KLF4, Calicreína 12, KLF5, Calicreína 13, KLF6, Calicreína 14, Klotho, Calicreína 15, Klotho beta, KC, KOR, Keapl, Kremen-1, Kell, Kremen-2, KGF/FGF-7, LAG-3, LINGO-2, LAIR1, Lipina 2, LAIR2, Lipocalina-1, Laminina alfa 4, Lipocalina-2/NGAL, Laminina gamma 1,5-Lipoxigenasa, Laminina I, LXR alfa/NR1H3, Laminina S, LXR beta/NR1H2, Laminina-1, Livina, Laminina-5, LIX, LAMP, LMIR1/CD300A, Langerina, LMIR2/CD300c, LAR, LMIR3/CD300LF, Latexina, LMIRS/CD300LB, Layilina, LMIR6/CD300LE, LBP, LMO2, LDL R, LOX-1/SR-E1, LECT2, LRH-1/NR5A2, LEDGF, LRIG1, Lefty, LRIG3, Lefty-1, LRP-1, Lefty-A, LRP-6, Legumaína, LSECtin/CLEC4G, Leptina, Lumican, Leptina R, CXCL15/Lungcina, Leucotrieno B4, XCL1/Linfotactina, Leucotrieno B4 R1, Linfotoxina, LIF, Linfotoxina beta/TNFSF3, LIF R alfa, Linfotoxina beta R/TNFSF3, LIGHT/TNFSF14, Lyn, Limitina, Lyp, LIMPPI/SR-B2, Homólogo de la lisil oxidasa 2, LIN-28, LYVE-1, LINGO-1, alfa 2-Macroglobulina, CXCL9/MIG, MAD2L1, Mimecan, MADCAM-1, Mindina, MafB, Mineralocorticoide R/NR3C2, MafF, CCL3L1/MIP-1 alfa Isoforma LD78 beta, MafG, CCL3/MIP-1 alfa, MafK, CCL4L1/LAG-1, MAG/Siglec-4-a, CCL4/MIP-1 beta, MANF, CCL15/MIP-1 delta, MAP2, CCL9/10/MIP-1 gamma, MAPK, MIP-2, Marapsina/Pancreasina, CCL19/MIP-3 beta, MARCKS, CCL20/MIP-3 alfa, MARCO, MIP-I, Mash1, MIP-II, Matrilina-2, MIP-III, Matrilina-3, MIS/AMH, Matrilina-4, MIS R11, Matriptase/ST14, MIXL1, MBL, MKK3/MKK6, MBL-2, MKK3, Melanocortina 3R/MC3R, MKK4, MCAM/CD146, MKK6, MCK-2, MKK7, Mc1-1, MKP-3, MCP-6, MLH-1, CCL2/MCP-1, MLK4 alfa, MCP-11, MMP, CCL8/MCP-2, MMP-1, CCL7/MCP-3/MARC, MMP-2, CCL13/MCP-4, MMP-3, CCL12/MCP-5, MMP-7, M-CSF, MMP-8, M-CSF R, MMP-9,

MCV-tipo II, MMP-10, MD-1, MMP-11, MD-2, MMP-12, CCL22/MDC, MMP-13, MDL-1/CLECSA, MMP-14, MDM2, MMP-15, MEA-1, MMP-16/MT3-MMP, MEK1/MEK2, MMP-24/MT5-MMP, MEK1, MMP-25/MT6-MMP, MEK2, MMP-26, Melusina, MMR, MEPE, MOG, Meprina alfa, CCL23/MP1F-1, Meprina beta, M-Ras/R-Ras3, Mer, Mrell, Mesotelina, MRP1 Meteorina, MSK1/MSK2, Metionina aminopeptidasa 1, MSK1, Metionina aminopeptidasa, MSK2, 5 Metionina aminopeptidasa 2, MSP, MFG-E8, MSP R/Ron, MFRP, Mug, MgcRacGAP, MULT-1, MGL2, Musashi-1, MGMT, Musashi-2, MIA, MuSK, MICA, MutY ADN glucosilasa, MICB, MyD88, MCL/CLEC12A, Mieloperoxidasa, beta 2-microglobulina, Miocardina, Midkine, Miocilina, MIF, Mioglobina, NAIP NGFI-B gamma/NR4A3, Nanog, Ngr2/NgRH1, CXCL7/NAP-2, NgR3/NgRH2, Nbsl, Nidogen-1/Entactina, NCAM-1/CD56, Nidogen-2, NCAM-L1, Óxido nítrico, Pectina-1, Nitrotirosina, Nectina-2/CD112, NKG2A, Nectina-3, NKG2C, Nectina-4, NKG2D, Neogenina, 10 Nkp30, Neprilisina/CD10, Nkp44, Neprilisina-2/MMEL1/MMEL2, Nkp46/NCR1, Nestina, Nkp80/KLRF1, NETO2, NKK2.5, Netrina-1, NMDA R, Subunidad NR1, Netrina-2, NMDA R, Subunidad NR2A, Netrina-4, NMDA R, Subunidad NR2B, Netrina-Gla, NMDA R, Subunidad NR2C, Netrina-G2a, N-Me-6,7-diOH-TIQ, Neurregulina-1/NRG1, Nodal, Neurregulina-3/NRG3, Noggin, Neuritina, Receptor de nogo, NeuroD1, Nogo-A, Neurofascina, 15 NOMO, Neurogenina-1, Nope, Neurogenina-2, Norrina, Neurogenina-3, eNOS, Neurolisina, iNOS, Neurofisina II, nNOS, Neuropilina-1, Notch-1, Neuropilina-2, Notch-2, Neuropoyetina, Notch-3, Neurotramina, Notch-4, Neurturina, NOV/CCN3, NFAM1, NRAGE, NF-H, NrCAM, NFkB1, NRL, NFkB2, NT-3, NF-L, NT-4, NF-M, NTB-A/SLAMF6, NG2/MCSP, NTH1, NGF R/TNFRSF16, Nucleostemina, beta-NGF, Nurr-1/NR4A2, NGFI-B alfa/NR4A1, OAS2, Orexina B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/Periostina, OCIL/CLEC2d, Oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC21, OSM R beta, Oct-3/4, Osteoactivina/GPNMB, OGG1, Osteoadherina, Olig 1, 2, 3, Osteocalcina, Olig1, Osteocrina, 20 Olig2, Osteopontina, Olig3, Osteoprotegerina/TNFRSF11B, Marcador de oligodendrocitos 01, Otx2, Marcador de oligodendrocitos 04, OV-6, OMgp, OX40/TNFRSF4, Opticina, Ligando de OX40/TNFSF4, Orexina A, OAS2, Orexina B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/Periostina, OCIL/CLEC2d, Oncostatina M/OSM, OCILRP2/CLEC21, OSM R beta, Oct-3/4, Osteoactivina/GPNMB, OGG1, Osteoadherina, Olig 1, 2, 3, Osteocalcina, Olig1, Osteocrina, Olig2, Osteopontina, Olig3, Osteoprotegerina/NFRSF11B, Marcador de oligodendrocitos 01, Otx2, Marcador de oligodendrocitos 04, OV-6, OMgp, OX40/TNFRSF4, Opticina, Ligando de OX40/TNFSF4, Orexina A, RACK1, Ret, Rad1, REV-ERB alfa/NR1D1, Rad17, REV-ERB beta/NR1D2, Rand51, Rev-1, Rae-1, RGM-A, Rae-1 alfa, RGM-B, Rae-1 beta, RGM-C, Rae-1 delta, Rheb, Rae-1 epsilon, Proteína ribosomal S6, Rae-1 gamma, RIP1, Raf-1, ROBO1, RAGE, ROBO2, Ra1A/Ra1B, ROBO3 Ra1A, ROBO4, Ra1B, ROR/NR1F1-3 (pan), RANK/TNFRSF11A, ROR alfa/NR1F1, CCL5/RANTES, ROR gamma/NR1F3, Rap1A/B, Receptor huérfano de tipo RTK 1/ROR1, RAR 25 alfa/NR1B1, Receptor huérfano de tipo RTK 2/ROR2, RAR beta/NR1B2, RP105, RAR gamma/NR1B3, RPA2, Ras, RSK (pan), RBP4, RSK1/RSK2, RECK, RSK1, Reg 2/PAP, RSK2, Reg I, RSK3, Reg II, RSK4, Reg III, R-Espondina 1, Reg Ma, R-Espondina 2, Reg IV, R-Espondina 3, Relaxina-1, RUNX1/CBFA2, Relaxina-2, RUNX2/CBFA1, Relaxina-3, RUNX3/CBFA3, RELM alfa, RXR alfa/NR2B1, RELM beta, RXR beta/NR2B2, RELT/TNFRSF19L, RXR gamma/NR2B3, Resistina, S100A10, SLITRK5, S100A8, SLP1, S100A9, SMAC/Diablo, S100B, Smad1, STOOP, 30 Smad2, SALL1, Smad3, delta-Sarcoglicano, Smad4, Sca-1/Ly6, Smad5, SCD-1, Smad7, SCF, Smad8, SCF R/c-kit, SMC1, SCGF, Actina de músculo liso alfa, SCL/Tall, SMUG1, SCP3/SYCP3, Snail, CXCL12/SDF-1, Intercambiador de sodio-calcio 1, SDNSF/MCFD2, Soggy-1, alfa-Secretasa, Sonic Hedgehog, gamma-Secretasa, S o CS1, beta-Secretasa, S o CS3, E-Selectina, Sortilina, L-Selectina, SOST, P-Selectina, SOX1, Semaforina 3A, SOX2, Semaforina 3C, SOX3, Semaforina 3E, SOX7, Semaforina 3F, SOX9, Semaforina 6A, SOX10, Semaforina 6B, 35 SOX17, Semaforina 6C, SOX21 Semaforina 6D, SPARC, Semaforina 7A, SPARCL 1, Separasa, SP-D, Sustrato de serina/treonina fosfatasa I, Espinesina, Serpina A1, F-Espondina, Serpina A3, SR-AI/MSR, Serpina A4/Calistatina, Src, Serpina A5/Inhibidor de la proteína C, SREC-I/SR-F1, Serpina A8/Angiotensinógeno, SREC-II, Serpina B5, SSEA-1, Serpina C1/Antitrombina-III, SSEA-3, Serpina D1/Cofactor de heparina II, SSEA-4, Serpina E1/PAI-1, 40 ST7/LRP12, Serpina E2, Estabilina-1, Serpina F1, Estabilina-2, Serpina F2, Estaniocalcina 1, Inhibidor de la serpina G1/C1, Estaniocalcina 2, Serpina 12, STAT1, Amiloide sérico A1, START2, SF-1/NR5A1, STAT3, SGK, STAT4, SHBG, STAT5a/b, SHIP, STAT5a, SHP/NROB2, STAT5b, SHP-1, STAT6, SHP-2, VE-Estatina, SIGIRR, Stella/Dppa3, Siglec-2/CD22, STRO-1, Siglec-3/CD33, Sustancia P, Siglec-5, Sulfamidas/SGSH, Siglec-6, Factor modificador de la sulfatasa 1/SUMF1, Siglec-7, Factor modificador de la sulfatasa 2/SUMF2, Siglec-9, SUMO1, Siglec-10, SUMO2/3/4, Siglec-11, SUMO3, Siglec-F, Superóxido dismutasa, SIGNR1/CD209, Superóxido dismutasa-1/Cu-Zn SOD, SIGNR4, Superóxido dismutasa-2/Mn-SOD, SIRP beta 1, Superóxido dismutasa-3/EC-SOD, SKI, 45 Survivina, SLAM/CD150, Sinapsina I, Transposasa Bella Durmiente, Sindecano-1/CD138, Slit3, Sindecano-2, SLITRK1, Sindecano-3, SLITRK2, Sindecano-4, SLITRK4, TAC1/TNFRSF13B, TMEFF1/Tomorregulina-1, TAO2, TMEFF2, TAPP1, TNF-alfa/TNFSF1A, CCL17/TARC, TNF-beta/TNFSF1B, Tau, TNF R1/TNFRSF1A, TC21/R-Ras2, TNF R11/TNFRSF1B, TCAM-1, TOR, TCCR/WSX-1, TP-1, TC-PTP, TP63/TP73L, TDG, TR, CCL25/TECK, TR 50 alfa/NR1A1, Tenascina C, TR beta 1/NR1A2, Tenascina R, TR2/NR2C1, TR-119, TR4/NR2C2, TERT, TRA-1-85, Testican 1/SPOCK1, TRADD, Testican 2/SPOCK2, TRAF-1, Testican 3/SPOCK3, TRAF-2, TFP1, TRAF-3, TFP1-2, TRAF-4, TGF-alfa, TRAF-6, TGF-beta, TRAIL/TNFSF10, TGF-beta 1, TRAIL R1/TNFRSF10A, LAP (TGF-beta 1), TRAIL R2/TNFRSF10B, TGF-beta 1 latente, TRAIL R3/TNFRSF10C, TGF-beta 1.2, TRAIL R4/TNFRSF10D, TGF-beta 2, TRANCE/TNFSF11, TGF-beta 3, TfR (Transferrina R), TGF-beta 5, Apo-Transferrina, TGF-beta bp1 latente, 55 Holo-Transferrina, TGF-beta bp2 latente, Trappin-2/Elefina, TGF-beta bp4 latente, TREM-1, TGF-beta RI/ALK-5, TREM-2, TGF-beta RII, TREM-3, TGF-beta RIIb, TREML1/TLT-1, TGF-beta RIII, TRF-1, Termolisina, TRF-2, Tiorredoxina-1, Ectoenzima degradadora de TRH/TRHDE, Tiorredoxina-2, TRIMs, Tiorredoxina-80, Tripeptidil-Peptidasa I, 5/TRP14 tipo tiorredoxina, TrkA, THOP1, TrkB, Trombomodulina/CD141, TrkC, Trombopoyetina, TROP-2, Trombopoyetina R, Troponina I Péptido 3, Tromboespondina-1, Troponina T, Tromboespondina-2, 60 TROY/TNFRSF19, Tromboespondina-4, Tripsina 1, Timopoyetina, Tripsina 2/PRSS2, Quimiocina del timo 1, Tripsina 3/PRSS3, Tie-1, Triptasa-5/Prss32, Tie-2, Triptasa alfa/TPS1, TIM-1/KIM-1/HAVCR, Triptasa beta-1/MCPT-7, TIM-2, 65

5 Triptasa beta-2/TPSB2, TIM-3, Triptasa épsilon/BSSP-4, TIM-4, Triptasa gamma-1/TPSG1, TIM-5, Triptófano hidroxilasa, TIM-6, TSC22, TIMP-1, TSG, TIMP-2, TSG-6, TIMP-3, TSK, TIMP-4, TSLP, TL1A/TNFSF15, TSLP R, TLR1, TSP50, TLR2, beta-III Tubulina, TLR3, TWEAK/TNFSF12, TLR4, TWEAK R/TNFRSF12, TLRS, Tyk2, TLR6, Fosfo-Tirosina, TLR9, Tirosina hidroxilasa, TLX/NR2E1, Sustrato de tirosina fosfatasa I, Ubiquitina, UNC5H3, Ugi, UNC5H4, UGRP1, UNG, ULBP-1, uPA, ULBP-2, uPAR, ULBP-3, URB, UNC5H1, UVDE, UNC5H2, R1 vaniloide, VEGF R, VASA, VEGF R1/Flt-1, Vasohibina, VEGF R2/KDR/Flik-1, Vasoferina, VEGF R3/Flt-4, Vasoestatina, Versican, Vav-1, VGSQ, VCAM-1, VHR, VDR/NR111, Vimentina, VEGF, Vitronectina, VEGF-B, VLDLR, VEGF-C, vWF-A2, VEGF-D, Sinucleína-alfa, Ku70, WASP, Wnt-7b, WIF-1, Wnt-8a WISP-1/CCN4, Wnt-8b, WNK1, Wnt-9a, Wnt-1, Wnt-9b, Wnt-3a, Wnt-10a, Wnt-4, Wnt-10b, Wnt-5a, Wnt-11, Wnt-5b, wnvNS3, Wnt7a, XCR1, XPE/DDB1, XEDAR, 10 XPE/DDB2, Xg, XPF, XIAP, XPG, XPA, XPV, XPD, XRCC1, Yes, YY1, EphA4.

Otros polipéptidos activos incluyen: BOTOX, Myobloc, Neurobloc, Dysport (u otros serotipos de neurotoxinas botulínicas), alglucosidasa alfa, daptomicina, YH-16, coriogonadotropina alfa, filgrastim, cetrorelix, interleucina-2, 15 aldesleucina, teceleucina, denileucina diftitox, interferón alfa -n3 (inyección), interferón alfa-n1, DL-8234, interferón, Suntory (gamma-1 a), interferón gamma, timosina alfa 1, tasonermina, DigiFab, ViperaTAb, EchiTAb, CroFab, nesiritida, abatacept, alefacept, Rebif, eptoteminalfa, teriparatida (osteoporosis), calcitonina inyectable (enfermedad ósea), calcitonina (nasal, osteoporosis), etanercept, hemoglobina glutamer 250 (bovina), drotrecogina alfa, colagenasa, carperitida, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (gel tópico, cicatrización de heridas), DWP-401, darbepoetina alfa, epoetina omega, epoetina beta, epoetina alfa, desirudina, lepirudina, 20 bivalirrudina, nonacog alfa, mononina, eptacog alfa (activado), factor VIII recombinante + VWF, Recombinate, factor VIII recombinante, factor VIII (recombinante), Alphanate, octocog alfa, factor VIII, palifermina, Indikinase, tenecteplasa, alteplasa, pamiteplasa, reteplasa, nateplasa, monteplasa, folitropina alfa, rFSH, hpFSH, micafungina, pegfilgrastim, tenograstim, nartograstim, sermorelina, glucagón, exenatida, pramlintida, imiglucerasa, galsulfasa, leucotropina, molgramostim, acetato de triptorelin, histrelina (implante subcutáneo, Hydron), deslorelin, histrelina, 25 nafarenilina, depósito de liberación sostenida de leuproliida (ATRIGEL), implante de leuproliida (DUROS), goserelina, somatropina, Eutropin, KP-102 program, somatropina, mecasermina (insuficiencia de crecimiento), enfuvirtida, Org-33408, insulina glargina, insulina glulisina, insulina (inhalada), insulina lispro, insulina detemir, insulina (bucal, RapidMist), rinfabato de mecasermina, anakinra, celmoleucina, 99 mTc-apcida inyección, mielopide, Betaseron, acetato de glatiramer, Gepon, sargamostim, oprelvequina, interferones alfa derivados de leucocitos humanos, Biliive, 30 insulina (recombinante), insulina humana recombinante, insulina aspart, mecasermina, Roferon-A, interferón-alfa 2, alfaferona, interferón alfacon-1, interferón alfa, hormona luteinizante humana recombinante de Avonex, dornasa alfa, trafermin, ziconotida, taltirelina, diboterminalfa, atosiban, becaplermina, eptifibatida, Zemaira, CTC-111, Shanvac-B, vacuna contra el VPH (tetravalente), NOV-002, octreótido, lanreótido, anestim, agalsidasa beta, agalsidasa alfa, 35 laronidasa, acetato de cobre de prezatida (gel tópico), rasburicasa, ranibizumab, Actimmune, PEG-Intron, Tricomin, inyección desensibilización de la alergia a los ácaros del polvo recombinante, hormona paratiroidea humana recombinante (PTH) 1-84 (sc, osteoporosis), epoetina delta, antitrombina III transgénica, Granditropin, Vitrase, insulina recombinante, interferón-alfa (pastilla para chupar oral), GEM- 21S, vapreotida, idursulfasa, omapatrilat, albúmina de suero recombinante, certolizumab pegol, glucarpidasa, inhibidor de la esterasa C1 recombinante humana (angioedema), lanoteplasa, hormona de crecimiento humana recombinante, enfuvirtida (inyección sin aguja, 40 Biojector 2000), VGV-1, interferón (alfa), lucinactant, aviptadilo (inhalado, enfermedad pulmonar), icatibant, ecalantida, omiganan, Aurograb, acetato de pexiganan, ADI-PEG-20, LDI-200, degarelix, cintredekin besudotox, Favld, MDX-1379, ISAtx-247, liraglutida, teriparalida (osteoporosis), tifacogina, AA-4500, loción liposómica T4N5, catumaxomab, DWP-413, ART-123, Chrysalin, desmoteplasa, amediplasa, corifolitropina alfa, TH-9507, teduglutida, Diamyd, DWP-412, hormona del crecimiento (inyección de liberación sostenida), G-CSF recombinante, insulina (inhalada, AIR), insulina (inhalada, Technosphere), insulina (inhalada, AERX), RGN-303, DiaPep277, interferón beta (infección por el virus de la hepatitis C (VHC)), interferón alfa-n3 (oral), belatacept, parches transdérmicos de insulina, AMG-531, MBP-8298, Xerecept, opebacán, AIDSVAX, GV-1001, LymphoScan, ranpirnasa, Lipoxyans, lusupultida, MP52 (portador beta-triclorofosfato, regeneración ósea), vacuna contra el melanoma, sipuleucel-T, CTP-37, Insegia, vitespen, trombina humana (congelada, hemorragia quirúrgica), trombina, TransMID, alfimeprasa, 45 Puricase, terlipresina (intravenosa, síndrome hepatorenal), EUR-1008M, FGF-1 recombinante (inyectable, enfermedad vascular), BDM-E, rotigaptida, ETC-216, P-113, MBI-594AN, duramicina (inhalada, fibrosis quística), SCV-07, OPI-45, endostatina, angiostatina, ABT-510, concentrado de inhibidor de Bowman Birk, XMP-629, 99 mTc-Hynic-Anexina V, kahalalido F, CTCE-9908, teverelix (liberación prolongada), ozarelix, romidepsina, BAY-50-4798, 50 interleucina-4, PRX-321, Pepscan, iboctadequina, lactoferrina, TRU-015, IL-21, ATN-161, cilengitida, Albuferon, Biphasix, IRX -2, interferón omega, PCK-3145, CAP-232, pasireotida, huN901-DM1, vacuna inmunoterapéutica contra el cáncer de ovario, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, vacuna del melanoma de péptido multi-epítopo (MART-1, gp100, tirosinasa), nemifitida, rAAT (inhalada), rAAT (dermatológica), CGRP (inhalada, asma), pegsunercept, timosina beta-4, plitidepsina, GTP-200, ramoplanina, GRASPA, OBI-1, AC-100, calcitonina de salmón (oral, eligen), calcitonina (oral, osteoporosis), examorelina, capromorelina, Cardeva, 55 velafermina, 131I-TM-601, KK-220, TP-10, ularitida, depelestat, hematide, Chrysalin (tópica), rNAPc2, Factor VIII recombinante (liposomal PFGilado), bFGF, variante de estafiloquinasa PEGilada recombinante, V-10153, SonoLysis Prolyse, NeuroVax, CZEN-002, terapia de neogénesis de células de los islotes, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, exenatida (liberación controlada, Medisorb ), AVE-0010, GA-GCB, avorelina, AOD-9604, acetato de linaclotida, CETI-1, Hemospan, VAL (inyectable), insulina de acción rápida (inyectable, Viadel), insulina intranasal, insulina (inhalada), insulina (oral, Eligen), metionil-leptina humana recombinante, inyección subcutánea de pitrakinra, 60 eczema), pitrakinra (polvo seco inhalado, asma), Multikine, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org- 65

39141, Cpn10 (enfermedades autoinmunitarias/inflamación), talactoferrina (tópica), rEV-131 (oftálmica), rEV-131 (enfermedad respiratoria), insulina humana recombinante oral (diabetes), RPI- 78M, oprelvequina (oral), CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, valategrast, interferón alfa-n3 (tópico), IRX-3, RDP-58, Tauferon, lipasa estimulada por sal biliar, Merispase, fosfatasa alcalina, EP-2104R, Melanotan-II, bremelanotida, ATL-104, microplasmina humana recombinante, AX-200, SEMAX, ACV-1, Xen-2174, CJC-1008, dinorfina A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, vacuna de la malaria (virosomas, PeviPRO), ALTU-135, vacuna del parvovirus B 19, vacuna gripe (neuraminidasa recombinante), vacuna de la malaria/VHB, vacuna contra el ántrax, Vacc-5q, Vacc-4 x, vacuna contra el VIH (oral), vacuna del VPH, Toxoide Tat, YSPSL, CHS-13340, PTH (1-34) crema liposomal (Novasome), Ostabinol-C, análogo de PTH (tópico, psoriasis), MBR1-93.02, vacuna MTB72F (tuberculosis), vacuna MVA-Ag85A (tuberculosis), FAR-404, BA-210, vacuna recombinante contra la plaga F1V, AG-702, OXSODro1, rBetVI, vacuna alérgica Der-p1/Der-p2/Der-p7 (alergia a los ácaros del polvo), antígeno péptido PR1 (leucemia), vacuna ras mutante, vacuna de lipopéptido HPV-16 E7, vacuna labyrinthin (adenocarcinoma), vacuna CML, vacuna WT1-peptido (cáncer), IDD-5, CDX-110, Pentrys, Norelin, CytoFab, P-9808, VT-111, icrocaptida, telbermina (dermatológica, úlcera del pie diabético), rupintrivir, reticulosa, rGRF, PIA, alfa-galactosidasa A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, vacuna terapéutica de angiotensina, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (oral, tuberculosis), DRF-7295, ABT-828, inmunotoxina específica de ErbB2 (anticáncerígena), DT3881L-3, TST-10088, PRO-1762, Combotox, péptidos de unión al receptor de colecistoquinina-B/gastrina, 111In-hEGF, AE-37, trastuzumab-DM1, antagonista G, IL-12 (recombinante), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (tópico), radioinmunoterapéuticos basados en L-19 (cáncer), Re-188-P-2045, AMG-386, vacuna DC/1540/KLH (cáncer), VX-001, AVE-9633, AC-9301, vacuna NY-ESO-1 (péptidos), péptidos NA17.A2, vacuna del melanoma (antígeno pulsado terapéutico), vacuna contra el cáncer de próstata, CBP-501, lactoferrina humana recombinante (ojo seco), FX-06, AP-214, WAP-8294A2 (inyectable), ACP-HIP, SUN-1 1031, péptido YY [3-36] (obesidad, intranasal), FGLL, atacicept, BR3-Fc, BN-003, BA-058, hormona paratiroides humana 1-34 (nasal, osteoporosis), F-18-CCR1, AT-1001 (enfermedad celíaca/diabetes), JPD-003, PTH (7-34) crema liposomal (Novasome), duramicina (oftálmica, ojo seco), CAB-2, CTCE-0214, eritropoyetina GlicoPEGilada, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, aminocandina, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, teverelix (liberación inmediata), EP-51216, hGH (liberación controlada, Bioesfera), OGP-I, sifuvirtida, TV-4710, ALG-889, Org-41259, rhCC10, F-991, timopentina (enfermedades pulmonares), r(m)PCR, insulina hepatoselectiva, subalina, proteína de fusión L19-IL-2, elafina, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, agonista del receptor de trombopoyetina (trastornos trombocitopénicos), AL-108, AL-208, antagonistas del factor de crecimiento nervioso (dolor), SLV-317, CGX-1007, INNO-105, teriparatida oral (Eligen), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, vacuna de fusión LFn-p24 (Therapore), EP-1043, vacuna pediátrica contra *S. pneumoniae*, vacuna contra la malaria, vacuna del Grupo B contra *Neisseria meningitidis*, vacuna estreptocócica del grupo B neonatal, vacuna contra el ántrax, vacuna contra el VHC (gpE1 + gpE2 + MF-59), terapia contra la otitis media, vacuna contra el VHC (antígeno del core + ISCOMATRIX), hPTH (1-34) (transdérmica, ViaDerm), 768974, SYN-101, PGN-0052, aviscumina, BIM-23190, vacuna contra la tuberculosis, péptido tirosinasa multi-epítopo, vacuna contra el cáncer, enkastim, APC-8024, G1-5005, ACC-001, TTS-CD3, TNF dirigido al sistema vascular (tumores sólidos), desmopresina (liberación controlada bucal), onercept, TP-9201.

Las secuencias de los ácidos nucleicos y aminoácidos de numerosas proteínas activas son bien conocidas en la técnica y las descripciones y secuencias están disponibles en bases de datos públicas tales como las bases de datos de Chemical Abstracts Services (por ejemplo, el registro CAS), GenBank, GenPept, Entrez Nucleotide, Entrez Protein, The Universal Protein Resource (UniProt) y las bases de datos proporcionadas por suscripción, como GenSeq (por ejemplo, Derwent). Las secuencias de polinucleótidos pueden ser una secuencia de polinucleótidos de tipo silvestre que codifica una proteína activa dada (por ejemplo, de longitud completa o madura), o en algunos casos la secuencia puede ser una variante de la secuencia de polinucleótidos de tipo silvestre (por ejemplo, un polinucleótido que codifica la proteína activa de tipo silvestre, en la que la secuencia de ADN del polinucleótido se ha optimizado, por ejemplo, para la expresión en una especie particular, o un polinucleótido que codifica una variante de la proteína de tipo silvestre, tal como un mutante dirigido al sitio o una variante alélica. Dentro de la capacidad del experto en la materia está el utilizar una secuencia de ADNc de tipo silvestre o consenso o una variante optimizada de codones de una proteína activa para crear construcciones de proteínas de fusión usando métodos conocidos en la técnica y/o junto con las directrices y los métodos proporcionados en la presente memoria y que se describen más detalladamente en los Ejemplos.

#### Propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión

La invención proporciona proteínas de fusión de proteínas terapéuticas activas con una farmacocinética mejorada en comparación con la proteína activa terapéutica no unida a un dominio de polipéptido mucina que, cuando se usa a la dosis óptima determinada para la composición mediante los métodos descritos en la presente memoria, puede mejorar la farmacocinética comparada a una dosis comparable de la proteína activa terapéutica no unida a un polipéptido con dominio mucina de acuerdo con la invención. Como se usa en la presente memoria, una "dosis comparable" significa una dosis con moles/kg equivalente para la proteína activa terapéutica que se administra a un sujeto de una manera comparable. Se entenderá en la técnica que una "dosificación comparable" de la proteína de fusión representaría un mayor peso del agente pero tendría esencialmente los mismos equivalentes en moles de la proteína activa terapéutica en la dosis de la proteína de fusión y/o tendría la misma concentración molar aproximada con respecto a la proteína activa terapéutica.

Las propiedades farmacocinéticas (PK) de una proteína activa terapéutica que pueden potenciarse uniendo un polipéptido con dominio mucina a la proteína activa terapéutica incluyen semivida, área bajo la curva (AUC),  $C_{\text{máx}}$ ,  $T_{\text{máx}}$ , relación entre la concentración de pico a valle y volumen de distribución. Las mejoras en las propiedades FC pueden conducir a mejoras en la eficacia debido a una mayor exposición, la reducción de los acontecimientos adversos debido a la reducción de la dosis y una amortiguación de  $C_{\text{máx}}$  y una reducción en la frecuencia de dosificación. Como se describe más completamente en los Ejemplos, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un polipéptido con dominio mucina unido a una proteína activa terapéutica que aumenta la semivida de la proteína de fusión administrada, en comparación con la proteína activa terapéutica correspondiente no unida a la proteína de fusión, al menos aproximadamente dos veces más, o al menos aproximadamente tres veces, o al menos aproximadamente cuatro veces, o al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente seis veces, o al menos aproximadamente siete veces, o al menos aproximadamente ocho veces, o al menos aproximadamente nueve veces, o al menos aproximadamente diez veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos 20 veces o más la semivida en comparación con la proteína activa terapéutica no unida a la proteína de fusión.

De manera similar, las proteínas de fusión pueden tener un aumento en la AUC de al menos aproximadamente 50 %, o al menos aproximadamente 60 %, o al menos aproximadamente 70 %, o al menos aproximadamente 80 %, o al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 100 %, o al menos aproximadamente 150 %, o al menos aproximadamente 200 %, o al menos aproximadamente 300 % de aumento de la AUC en comparación con la proteína activa terapéutica correspondiente no unida a la proteína de fusión. Los parámetros farmacocinéticos de la semivida y el AUC de una proteína de fusión se pueden determinar mediante métodos estándar que incluyen la dosificación, la toma de muestras de sangre en intervalos de tiempo y el ensayo de la proteína mediante ELISA, HPLC, radioensayo u otros métodos conocidos en la técnica o como se describe en la presente memoria, seguido de cálculos estándar de los datos para derivar la semivida y otros parámetros FC.

Los aumentos en la semivida dan como resultado una reducción de la relación de concentración de pico a valle, suavizando el perfil de concentración frente a tiempo cuando se administran dosis múltiples. La exposición más constante puede dar como resultado una eficacia mejorada, así como una reducción de los acontecimientos adversos, que a menudo son impulsados por una alta  $C_{\text{máx}}$  (concentraciones supraterapéuticas). La duración prolongada de las dosis individuales también reduce la frecuencia de la dosis, dando como resultado una reducción de los acontecimientos adversos relacionados con la administración (como las reacciones en el lugar de la inyección), el cumplimiento mejorado y la mayor comodidad para el paciente.

#### Propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas

Además de potenciar las propiedades FC de una proteína activa terapéutica, la fusión a un polipéptido con dominio mucina puede ser útil para mejorar las propiedades farmacéuticas o fisicoquímicas (tales como el grado de solubilidad acuosa) del péptido o proteína terapéuticamente activo. El aumento de la solubilidad puede mediarse tanto mediante la adición de hidratos de carbono altamente hidrófilos en la mucina como mediante la selección de la secuencia de polipéptido de mucina apropiada, que puede contener adicionalmente restos ionizables tales como ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina y arginina. Los restos ionizables dan como resultado la modulación del pI de la proteína de fusión y, por lo tanto, la carga total de la proteína en una formulación particular.

Las proteínas de fusión se pueden construir y ensayar, usando los métodos descritos en la presente memoria, para confirmar las propiedades fisicoquímicas de la proteína de fusión que dan como resultado las propiedades deseadas. En un aspecto, el polipéptido con dominio mucina se selecciona de manera que la proteína de fusión tenga una solubilidad acuosa que sea al menos aproximadamente un 25 % mayor en comparación con una proteína activa terapéutica no unida a la proteína de fusión, o al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente 40 %, o al menos aproximadamente 50 %, o al menos aproximadamente 75 %, o al menos aproximadamente 100 %, o al menos aproximadamente 200 %, o al menos aproximadamente 300 %, o al menos aproximadamente 400 %, o al menos al menos aproximadamente 500 %, o al menos aproximadamente 1000 % mayor que la proteína activa terapéutica correspondiente no unida a la proteína de fusión. Las secuencias del polipéptido con dominio mucina preferidas pueden tener al menos 80 % de identidad de secuencia, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 91 %, o aproximadamente 92 %, o aproximadamente 93 %, o aproximadamente 94 %, o aproximadamente 95 %, o aproximadamente 96 %, o aproximadamente 97 %, o aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 %, hasta aproximadamente 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido con dominio mucina seleccionado de la Tabla I.

#### Usos de las proteínas de fusión

En otro aspecto, la memoria descriptiva divulga un método para lograr un efecto beneficioso en una enfermedad, trastorno o afección mediada por una proteína terapéuticamente activa. La presente memoria trata las desventajas y/o limitaciones de las proteínas terapéuticas activas que tienen una semivida terminal relativamente corta y/o una ventana terapéutica estrecha entre la dosis eficaz mínima y la dosis máxima tolerada.

En un aspecto, la memoria descriptiva divulga un método para lograr un efecto beneficioso en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de una proteína de fusión. La cantidad efectiva puede producir un efecto beneficioso para ayudar a tratar una enfermedad o trastorno. En algunos casos, el método para lograr un efecto beneficioso puede incluir administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de proteína de fusión para tratar en un sujeto enfermedades y categorías de enfermedad en las que una proteína o péptido terapéutico no unido a un polipéptido con dominio mucina exhibe una semivida subóptima. En otros casos, el método para lograr un efecto beneficioso puede incluir administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de proteína de fusión para tratar en un sujeto enfermedades y categorías de enfermedad para las que no existe una proteína o péptido terapéutico. En otros casos, el método para lograr un efecto beneficioso puede incluir administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de proteína de fusión para tratar en un sujeto enfermedades y categorías de enfermedad en las que una proteína o péptido terapéutico exhibe un efecto inhibidor estimulador subóptimo o un efecto inhibidor subóptimo como agonista o antagonista, respectivamente.

Las enfermedades susceptibles de tratamiento mediante administración de las composiciones divulgadas en la presente memoria incluyen, sin limitación, cáncer, enfermedades inflamatorias, artritis, osteoporosis, infecciones en particular hepatitis, infecciones bacterianas, infecciones virales, enfermedades genéticas, enfermedades pulmonares, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad hormonal, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardíacas, infarto de miocardio, trombosis venosa profunda, enfermedades del sistema circulatorio, hipertensión, hipotensión, alergias, alivio del dolor, enanismo y otros trastornos del crecimiento, intoxicaciones, enfermedades de la coagulación sanguínea, enfermedades del sistema inmunitario innato, embolia, cicatrización de heridas, curación de quemaduras, enfermedad de Crohn, asma, úlcera, sepsis, glaucoma, isquemia cerebrovascular, síndrome de dificultad respiratoria, úlceras corneales, enfermedad renal, úlcera del pie diabético, anemia, deficiencia de factor IX, deficiencia de factor VIII, deficiencia de factor VII, mucositis, disfagia, trastorno trombocítico, embolia pulmonar, infertilidad, hipogonadismo, leucopenia, neutropenia, endometriosis, enfermedad de Gaucher, obesidad, enfermedad de almacenamiento lisosomal, SIDA, síndrome premenstrual, síndrome de Turner, caquexia, distrofia muscular, enfermedad de Huntington, colitis, SARS, sarcoma de Kaposi, tumor hepático, tumor de mama, glioma, linfoma no Hodgkin, leucemia mielocítica crónica; leucemia de células pilosas; carcinoma de células renales; tumor hepático; linfoma; melanoma, esclerosis múltiple, sarcoma de Kaposi, virus del papiloma, enfisema, bronquitis, enfermedad periodontal, demencia, parto, cáncer de pulmón microcítico, tumor de páncreas, tumor de próstata, acromegalia, psoriasis, tumor de ovario, enfermedad de almacenamiento lisosomal.

En un aspecto, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que comprende una proteína activa terapéutica unida a un polipéptido con dominio mucina y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto que lo necesita y que da como resultado una mayor mejora en al menos un parámetro, condición fisiológica o resultado clínico mediado por la proteína activa terapéutica de la proteína de fusión en comparación con el efecto mediado por la administración de una composición farmacéutica que comprende una proteína activa terapéutica no unida al polipéptido con dominio mucina administrado a una dosis comparable. En un aspecto, la composición farmacéutica se administra a una dosis terapéuticamente efectiva. En otro aspecto, la composición farmacéutica se administra usando múltiples dosis simultáneas o secuenciales usando un régimen posológico terapéuticamente eficaz (como se define en la presente memoria) durante la duración del período de administración.

Como resultado de los parámetros farmacocinéticos mejorados de la proteína de fusión, como se describe en la presente memoria, como la semivida prolongada, la proteína activa terapéutica unida a un polipéptido con dominio mucina se puede administrar usando intervalos más largos entre dosis en comparación con la proteína activa terapéutica correspondiente no unida al polipéptido con dominio mucina para prevenir, tratar, aliviar, revertir o mejorar los síntomas o anomalías clínicas de la enfermedad, trastorno o afección o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos contrarrestan cualquier efecto tóxico o perjudicial de la proteína de fusión. Una cantidad profilácticamente eficaz se refiere a una cantidad de proteína de fusión requerida durante el período de tiempo necesario para lograr el resultado profiláctico deseado.

En un aspecto, un método de tratamiento comprende la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión a un sujeto que la necesita que da como resultado un aumento de la semivida de la proteína activa terapéutica en comparación con una dosis comparable de la proteína activa terapéutica no unida a un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la memoria descriptiva divulga métodos para fabricar proteínas de fusión para mejorar la facilidad de fabricación de tecnologías de prolongación de la semivida que requieren un acoplamiento químico posterior a la expresión, y que da como resultado una mayor estabilidad, un aumento de la solubilidad en agua y/o facilidad de formulación, en comparación con las proteínas activas terapéuticas nativas. En un aspecto, la memoria descriptiva divulga un método para aumentar la solubilidad acuosa de una proteína activa terapéutica que comprende la etapa de unir la proteína activa terapéutica a un

polipéptido con dominio mucina seleccionado de manera que se puede lograr una mayor concentración en forma soluble de la fusión resultante, en condiciones fisiológicas o en una formulación terapéuticamente aceptable, en comparación con la proteína activa terapéutica no unida a un polipéptido con dominio mucina. Los factores que contribuyen a la propiedad del polipéptido con dominio mucina para conferir una mayor solubilidad en agua de la proteína activa cuando se incorporan a una proteína de fusión incluyen el alto porcentaje de glucosilación, el tipo de glicanos y la carga de los aminoácidos del polipéptido con dominio mucina. En algunas realizaciones, el método da como resultado una proteína de fusión donde la solubilidad en agua es al menos aproximadamente 50 %, o al menos aproximadamente 60 % mayor, o al menos aproximadamente 70 % mayor, o al menos aproximadamente 80 % mayor, o al menos aproximadamente 90 % mayor, o al menos aproximadamente 100 % mayor, o al menos aproximadamente 150 % mayor, o al menos aproximadamente 200 % mayor, o al menos aproximadamente 400 % mayor, o al menos aproximadamente 600 % mayor, o al menos aproximadamente 800 % mayor, o al menos aproximadamente 1000 % mayor, o al menos aproximadamente 2000 % mayor, o al menos aproximadamente 4000 % mayor, o al menos aproximadamente 6000 % mayor en condiciones fisiológicas, o en una formulación terapéuticamente aceptable, en comparación con la proteína activa terapéutica nativo proteína.

15 Secuencias de ácidos nucleicos

La presente invención proporciona ácidos polinucleicos aislados que codifican proteínas de fusión y secuencias complementarias a moléculas de ácido polinucleico que codifican proteínas de fusión de la invención. En otro aspecto, la invención abarca métodos para producir ácidos polinucleicos que codifican proteínas de fusión de la invención y secuencias complementarias a las proteínas de fusión de la invención, que incluyen variantes homólogas. En general, la invención proporciona métodos para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de fusión y expresar el producto génico resultante que incluye ensamblar nucleótidos que codifican cada uno de los polipéptidos del dominio mucina y proteínas activas, unir los componentes en el marco, incorporar el gen codificador en una vector de expresión apropiado, transformar una célula hospedadora apropiada con el vector de expresión, haciendo así que la proteína de fusión se exprese en la célula hospedadora transformada, produciendo de ese modo la proteína de fusión de la invención. Se pueden usar técnicas recombinantes estándar en biología molecular para preparar los polinucleótidos y vectores de expresión de la presente invención. De acuerdo con la invención, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión pueden usarse para generar moléculas de ADN recombinante que dirigen la expresión de las proteínas de fusión en células hospedadoras apropiadas. Se prevén varias estrategias de clonación adecuadas para realizar la presente invención, muchas de las cuales se pueden usar para generar una construcción que comprende un gen que codifica una proteína de fusión o su complemento. En una realización, la estrategia de clonación se usaría para crear un gen que codifica una proteína de fusión monomérica que comprende una proteína activa y un polipéptido con dominio mucina. En las realizaciones anteriores descritas anteriormente en este párrafo, el gen puede comprender además nucleótidos que codifican secuencias espaciadoras que también pueden codificar la secuencia o secuencias de escisión.

40 En un enfoque, primero se prepara una construcción que contiene la secuencia de ADN correspondiente a una proteína de fusión. El ADN que codifica una proteína activa y/o polipéptido con dominio mucina puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADNc preparada usando métodos estándar de tejido o células aisladas que se cree que poseen el ARNm de una proteína activa y se expresa a un nivel detectable. Si es necesario, la secuencia de codificación puede obtenerse usando procedimientos de extensión de cebador convencionales como se describe en Sambrook, et al., supra, para detectar precursores y e intermedios del procesamiento del ARNm que pueden no haberse transcrita de forma inversa en ADNc. Por consiguiente, el ADN se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tales fuentes. El gen o genes codificadores también se pueden obtener de una biblioteca genómica o crear mediante procedimientos sintéticos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada) usando secuencias de ADN obtenidas de bases de datos públicas, patentes o referencias bibliográficas. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica y están bien descritos en la literatura científica y de patentes. Por ejemplo, se pueden obtener secuencias de los números de registro de Chemical Abstracts Services (CAS) (publicados por la Sociedad Americana de Química) y/o los números de acceso de GenBank disponibles a través de la página web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), disponible en la web en [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) que corresponden a las entradas en el Registro CAS o la base de datos GenBank que contienen una secuencia de aminoácidos de la proteína activa o de un fragmento o variante de la proteína activa o del polipéptido con dominio mucina.

60 Un gen o polinucleótido que codifica la proteína activa, por ejemplo, puede a continuación clonarse en una construcción, que puede ser un plásmido u otro vector bajo el control de secuencias de transcripción y traducción apropiadas para la expresión proteica de alto nivel en un sistema biológico. En una etapa posterior, un segundo gen o polinucleótido que codifica el polipéptido con dominio mucina, por ejemplo, está genéticamente fusionado a los nucleótidos que codifican el extremo N y/o C del gen de la proteína activa clonándolo en la construcción adyacente y en el marco con el gen o los genes que codifican la proteína activa.

65 Los polinucleótidos resultantes que codifican los polipéptidos de fusión pueden a continuación clonarse individualmente en un vector de expresión. La secuencia de ácido nucleico se puede insertar en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción

5 apropiados usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar que son conocidas por los expertos en la materia. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica y están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes.

10 Los vectores, los hospedadores y los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia de la expresión recombinante. Varios vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas y además permite la expresión y la modificación postraduccional de la proteína recombinante dentro de la célula hospedadora.

15 20 La presente invención también proporciona una célula hospedadora para expresar las composiciones de proteínas de fusión monoméricas de la invención. Los ejemplos de células hospedadoras eucarióticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, hospedadores de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*; hospedadores de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* Sf9, *Spodoptera frugiperda* Sf21 y células High Five y hospedadores de mamíferos tales como células de fibroblastos de ratón (C 127-BPV), células de ovario de hámster chino (CHO-DHFR, CHO-NEOSPLA, CHO-GS) y células de mieloma de ratón (NSO-GS).

25 30 Las proteínas de fusión expresadas se pueden purificar mediante métodos conocidos en la técnica o mediante métodos divulgados en la presente memoria. Se pueden usar procedimientos tales como filtración en gel, purificación por afinidad, fraccionamiento de sal, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de adsorción de hidroxiapatita, cromatografía de interacción hidrófoba y electroforesis en gel; cada uno adaptado para recuperar y purificar la proteína de fusión producida por las respectivas células hospedadoras. Los métodos de purificación se describen en Robert K. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Charles R. Castor (ed.), Springer-Verlag 1994 y Sambrook, et al., supra. Las separaciones de purificación multietapa también se describen en Baron, et al., Crit. Rev. Biotechnol. 10: 179-90 (1990) y Below, et al., J. Chromatogr. A. 679:67-83 (1994).

#### Composiciones farmacéuticas

35 40 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión de la invención. En una realización, la composición farmacéutica comprende la proteína de fusión y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en los cuales el polipéptido se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como soluciones acuosas o tampones, suspensiones y emulsiones farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propiletilenglicol, 45 polietilenglicol y aceites vegetales. Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mezclando el principio activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

50 55 60 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, intransal, parenteral o mediante terapia de inhalación, y pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, gránulos, cápsulas, píldoras, ampollas, supositorios o en forma de aerosol. También pueden estar en forma de suspensiones, soluciones y emulsiones del principio activo en diluyentes acuosos o no acuosos, jarabes, granulados o polvos. Además, las composiciones farmacéuticas también pueden contener otros compuestos farmacéuticamente activos o una pluralidad de compuestos de la invención.

Más particularmente, las presentes composiciones farmacéuticas pueden administrarse para terapia por cualquier ruta adecuada incluyendo oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo transdérmica, en aerosol, bucal y sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, subcutánea o intratecal mediante bomba de infusión, intramuscular), intravenosa e intradérmico), intravítreo y pulmonar. También se apreciará que la ruta preferida variará con el agente terapéutico, el estado y la edad del receptor, y la enfermedad que se está tratando.

65 En un aspecto preferido, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Generalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En otro aspecto preferido, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En esta realización, la composición se puede suministrar como un polvo liofilizado para reconstituir antes de la administración. La composición también se puede suministrar en forma líquida, que se puede administrar directamente a un paciente. En una realización, la composición se suministra como un líquido en una jeringa precargada de manera que un paciente puede autoadministrarse fácilmente la composición.

En otro aspecto, las composiciones de la presente invención se encapsulan en liposomas, que han demostrado utilidad en la administración de agentes activos beneficiosos de una manera controlada durante períodos de tiempo prolongados. Los liposomas son membranas bicapa cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas también pueden ser vesículas unilaminares que poseen una sola membrana bicapa o vesículas multilaminares con múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa. La estructura de la bicapa de membrana resultante es tal que las colas hidrófobas (no polares) del lípido están orientadas hacia el centro de la bicapa, mientras que las cabezas hidrófilas (polares) se orientan hacia la fase acuosa. En una realización, el liposoma se puede recubrir con un polímero soluble en agua flexible que evita la absorción por los órganos del sistema de fagocitos mononucleares, principalmente el hígado y el bazo. Polímeros hidrófilos adecuados para rodear los liposomas incluyen, sin limitación, PEG, secuencias de polivinilpirrolidona, polivinilmetyléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato, polihidroximetacrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol, poliaspartamida y secuencias de péptido hidrófilo como se describen en las patentes US-6.316.024; US-6.126.966; US-6.056.973 y US-6.043.094.

Los liposomas pueden estar compuestos por cualquier lípido o combinación de lípidos conocida en la técnica. Por ejemplo, los lípidos formadores de vesículas pueden ser lípidos sintéticos o de origen natural, incluidos fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y esfingomielina como se describe en las patentes US-6.056.973 y US-5.874.104. Los lípidos formadores de vesículas también pueden ser glicolípidos, cerebrósidos o lípidos catiónicos, tales como 1,2-dioleiloxy-3-(trimetilamino)propano (DOTAP); bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE); bromuro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DORIE); cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); 3-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol); o dimetildioctadecilamonio (DDAB) también como se divulga en la patente US-6.056.973. El colesterol también puede estar presente en el intervalo apropiado para impartir estabilidad a la vesícula como se divulga en las patentes US-5.916.588 y US-5.874.104.

Para las formulaciones líquidas, una propiedad deseada es que la formulación se suministre en una forma que pueda pasar a través de una aguja de calibre 25, 28, 30, 31, 32 para administración intravenosa, intramuscular, intraarticular o subcutánea.

En otros aspectos, la composición puede administrarse por vía intranasal, bucal o sublingual al cerebro para permitir la transferencia de los agentes activos a través de los conductos olfativos hacia el SNC y reducir la administración sistémica. Los dispositivos comúnmente utilizados para esta vía de administración se incluyen en la patente US-6.715.485. Las composiciones administradas a través de esta vía pueden permitir una mayor administración en el SNC o una carga corporal total reducida, lo que reduce los riesgos de toxicidad sistémica asociados con ciertos fármacos. La preparación de una composición farmacéutica para administración en un dispositivo implantable subdérmicamente se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en, por ejemplo, en las patentes US-3.992.518; US-5.660.848; y US-5.756.115.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no deben interpretarse como limitativos de la invención tal como se reivindica de ninguna manera.

### Ejemplo 1. Diseño, preparación, expresión y purificación de construcciones de fusión con dominio mucina

#### *1. Diseño de proteínas de fusión de IL-1Ra muciniladas*

Se diseñaron proteínas de fusión de IL-1Ra con longitudes variables de mucinilación. La longitud del dominio mucina se aumentó sistemáticamente al variar el número de repeticiones en tandem de mucina. Los dominios mucinilados de las proteínas de fusión se basaron en la repetición en tandem (TR) de la proteína MUC20 humana. Se diseñaron proteínas de fusión de IL-1Ra con 2TR, 4TR, 6TR, 8TR y 12TR, designadas RDB1813 [SEQ ID NO: 1 (proteína); SEQ ID NO: 2 (ADN)], RDB1814 [SEQ ID NO: 3 (proteína); SEQ ID NO: 4 (ADN)], RDB1826 [SEQ ID NO: 5 (proteína); SEQ ID NO: 6 (ADN)], RDB1815 [SEQ ID NO: 7 (proteína); SEQ ID NO: 8 (ADN)] y RDB1816 [SEQ ID NO: 9 (proteína); SEQ ID NO: 10 (ADN)], respectivamente. Se insertó un enlazador de 4 glicinas (GGGG [SEQ ID NO: 27]) entre el extremo C de la secuencia IL-1Ra y la primera TR de mucina, y entre cada conjunto de 2 TR de mucina. Se añadió una etiqueta His al extremo C de RDB1813, RDB1814, RDB1815 y RDB1816, y una etiqueta FLAG al extremo C de RDB1826 para facilitar la purificación.

2. Diseño de la proteína de fusión exendina-4 mucinilada RDB2203

Se diseñó una proteína de fusión de exendina-4 con 8TR de la proteína MUC20 humana: RDB2203 [SEQ ID NO: 24]. Se insertó un enlazador de 4 glicinas (GGGG (SEQ ID NO: 27)) entre el extremo C de la secuencia de exendina-4 y la primera mucina TR, y entre cada conjunto de 2 TR de mucina. Se añadió una etiqueta His al extremo C para facilitar la purificación, con un espaciador (GGGGS (SEQ ID NO: 28)) entre la TR final y la etiqueta His.

3. Síntesis de genes

10 La síntesis de los genes para la expresión de las construcciones diseñadas se llevó a cabo usando métodos estándar.

4. Subclonación del gen sintetizado en un vector de expresión de mamífero

15 A) Preparación del vector de expresión pcDNA™ (Invitrogen).

20 Se digirió 5 µg de pcDNA se digirió con BamHI y HindIII durante dos horas a 37 °C. Lo digerido se trató con fosfatasa alcalina de ternera para eliminar el fosfato 5', evitando así la religación del vector en sí mismo. El tampón se intercambió para eliminar las sales de la reacción de la fosfatasa alcalina de ternera. El kit de limpieza de PCR de Qiagen se usó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN se eluyó en 30 µl de H<sub>2</sub>O.

B) Preparación del gen de interés.

25 El gen de interés se digirió con BamHI y HindIII durante dos horas a 37 °C. La reacción de digestión se realizó en un aparato E-Gel® CloneWell™ (Invitrogen) usando SYBR Green 0,8 %. El fragmento correspondiente al gen de interés se aisló de la segunda fila de pocillos en el gel.

C) Reacción de ligación del gen al pcDNA.

30 El pcDNA preparado (etapa A) se mezcló con el ADN de la etapa B en presencia de ligasa T4 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la ligación, los productos se transformaron en células TOP10 (Invitrogen, cepa químicamente competente de *E. coli*) y se recogió el clon correcto y se almacenó como un stock de glicerol a -80 °C.

35 5. Expresión de las proteínas de fusión IL-1Ra y exendina-4 muciniladas

Todas las proteínas se expresaron en células CHO usando FreeStyle™ MAX Reagent (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, un día antes de la transfección, las células se sembraron a razón de  $0,5 \times 10^6$  células/ml, y en el día de la transfección se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células/ml según lo recomendado por el fabricante.

40 Para una transfección de 1 litro, se prepararon dos tubos (A y B) de medio (OptiPRO™, Invitrogen), que contenían cada uno aproximadamente 19 ml. Se añadió 1 mg de ADN al tubo A, y se añadió 1 ml de FreeStyle™ MAX Reagent al tubo B. Inmediatamente, el contenido de ambos tubos se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después del período de incubación, la mezcla se añadió lentamente a 1 litro de células CHO. Después de la transfección, las células se dejaron durante 6 a 7 días y luego se recogió el sobrenadante.

45 6. Purificación de las proteínas de fusión de IL-1Ra y exendina-4 muciniladas

50 La purificación de las proteínas expresadas con etiqueta His se llevó a cabo en una columna de níquel. Después de unir la proteína, la columna se lavó con hasta 5 volúmenes de la columna de tampón A (Tris 50 mM pH8 y NaCl 500 mM). La proteína unida se eluyó con una concentración creciente de imidazol (20 a 500 mM). La proteína purificada se dializó durante la noche frente a PBS.

55 La RDB1826 se purificó en una columna anti-FLAG. Después de unir la proteína, la columna se lavó con hasta 5 volúmenes de columna de PBS. La proteína se eluyó a pH 3 y se neutralizó directamente con tampón Tris pH 7. La proteína purificada se dializó durante la noche frente a PBS.

Ejemplo 2. Pesos moleculares y pl de construcciones de mucina-IL-1Ra

60 Las proteínas de fusión IL-1Ra-mucina RDB1813 (IL1Ra 2TR), RDB1814 (IL1Ra 4TR), RDB1815 (IL1Ra 8TR) y RDB1816 (IL1Ra 12TR) se caracterizaron usando SDS/PAGE (Figura 1A). El peso molecular aparente de todas las construcciones es significativamente mayor que el peso molecular calculado de la secuencia polipeptídica, lo que es consistente con el alto nivel esperado de glicosilación. Los respectivos pesos moleculares calculados de los polipéptidos para RDB1813, RDB1814, RDB1815 y RDB1816 son 22 kD, 26,2 kD, 34,8 kD y 43,3 kD, y sus respectivos pesos moleculares aparentes basados en su movilidad en el gel son 35 kD, 45 kD, 65 kD, y 80 kD (Fig. 1A, flechas).

Los puntos isoeléctricos de las construcciones RDB1813 (IL1Ra 2TR), RDB1826 (IL1Ra 6TR), RDB1815 (IL1Ra 8TR) y RDB1816 (IL1Ra 12TR) se midieron usando enfoque isoeléctrico (Fig. 1B). Todas las construcciones fueron heterogéneas con respecto a la carga, con múltiples bandas alrededor del PI de la proteína. Los PI de la proteína estaban en gran medida en línea con sus PI calculados basados en la secuencia polipeptídica, lo que sugiere que los O-glicanos no están fuertemente sialilados. La multiplicidad de bandas probablemente se deba a diferencias en la N-glucosilación.

Todas las construcciones se caracterizaron adicionalmente mediante filtración analítica en gel en una columna Superdex 200 (Figuras 2-6). La filtración en gel separa proteínas en función de su volumen hidrodinámico en condiciones nativas (es decir, a diferencia de SDS/PAGE, no es desnaturalizante). Los tiempos de elución se pueden calibrar con patrones de proteínas globulares de manera que se pueda calcular el peso molecular aparente para una proteína globular desconocida. Como el tiempo de elución está más directamente relacionado con el radio hidrodinámico en lugar del peso molecular real, los pesos moleculares aparentes que son significativamente más altos que sus pesos moleculares calculados sugieren estructuras no globulares (es decir, alargadas o similares a varillas), altos niveles de glicosilación y/o altos niveles de hidratación.

En la filtración en gel, los pesos moleculares aparentes para RDB1813, RDB1814, RDB1826, RDB1815 y RDB1816 son, 42 kD, 50 kD, 118 kD, 139 kD y 230 kD, respectivamente (Figuras 2-6). Los pesos moleculares aparentes de todas las construcciones de mucina fueron significativamente mayores que sus pesos moleculares calculados (basados en la secuencia de aminoácidos sola) y su movilidad en SDS/PAGE. Estas observaciones son altamente consistentes tanto con el alto nivel de glicosilación como con la estructura de tipo varilla esperada de las construcciones de mucina.

#### Ejemplo 3. Actividades antagonistas de las construcciones de mucina-IL-1Ra

Las células HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  (Invivogen) son células de riñón embrionario humano diseñadas específicamente para detectar IL-1 $\beta$  bioactiva *in vitro* controlando la expresión inducida por IL-1 $\beta$  de un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF- $\kappa$ B/AP-1. El SEAP se puede monitorizar fácilmente cuando se utiliza el medio de detección SEAP QUANTI-Blue™ (Invivogen). IL-1Ra inhibe esta señal inducida por IL-1 $\beta$  mediante la unión de IL-1RI, evitando la unión de IL-1RAcP, y por lo tanto ensamblando el complejo de señalización completo. La capacidad de las construcciones de mucina-IL1Ra RDB1813 (IL1Ra 2TR), RDB1814 (IL1Ra 4TR), RDB1826 (IL1Ra 6TR), RDB1815 (IL1Ra 8TR) y RDB1816 (IL1Ra 12TR) para inhibir la SEAP inducida por IL-1 $\beta$ . IL1Ra (anakinra) que carece de un dominio mucina fusionado se usó como un control antagonista positivo.

Se sembraron 100  $\mu$ l de medio que contenía células HEK-Blue™ IL-1 $\beta$  en placas de microtitulación de 96 pocillos hasta una concentración final de 50.000 células/pocillo. Las construcciones de mucina-IL1Ra RDB1813 (IL1Ra 2TR), RDB1814 (IL1Ra 4TR), RDB1826 (IL1Ra 6TR), RDB1815 (IL1Ra 8TR) y RDB1816 (IL1Ra 12TR) se prepararon en concentraciones iniciales de 12nM (RDB1813), 4,8 nM (RDB1814) , 34,5 nM (RDB1826), 2,4 nM (RDB1815) y 11,6 nM (RDB1816), después se diluyeron en serie y se añadieron en muestras de prueba duplicadas a las células HEK-Blue™ IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  a 0,015 nM se utilizó en todas las muestras de prueba para inducir la SEAP. Se usaron IL-1 $\beta$  0,117 nM solo e IL-1Ra 11,76 nM + IL-1 $\beta$  0,015 nM en muestras de control. Las muestras se incubaron a 37 °C, durante 20-24 horas y se evaluaron usando el ensayo QUANTI-Blue™.

Las construcciones de mucina-IL1Ra RDB1813 (IL1Ra 2TR), RDB1814 (IL1Ra 4TR), RDB1826 (IL1Ra 6TR), RDB1815 (IL1Ra 8TR), y RDB1816 (IL1Ra 12TR) inhibieron la expresión de SEAP inducida por IL-1 $\beta$  de una manera dependiente de la dosis, con valores IC<sub>50</sub> valores de 0,72 nM, 0,37 nM, 3,5 nM, 0,42 nM y 0,53 nM, respectivamente, comparando favorablemente con el valor IC<sub>50</sub> del control (IL1Ra no modificado) de 0,1- 0,15 nM (figuras 7-9). Por lo tanto, la actividad inhibidora de todas las construcciones muciniladas está dentro de unas pocas veces de la proteína control IL1Ra no modificada (no mucinilada).

#### Ejemplo 4. Afinidad de unión de mucina-IL-1Ra a IL-1RI

Se inmovilizó IL-1RI\_Fc (proteína de fusión) en un chip sensor Biacore™ utilizando el Human Antibody Capture Kit (GE Healthcare). La IL-1Ra no modificada (control de unión positiva), RDB1813 (IL1Ra 2TR), RDB1814 (IL1Ra 4TR), RDB1815 (IL1Ra 8TR) y RDB1826 (IL1Ra 6TR) se hicieron fluir sobre el chip a 5 concentraciones: 20 nM , 6,6 nM, 2,2 nM, 0,74 nM y 0,24 nM. En el primer ciclo, la concentración 0,24 nM de la construcción específica se hizo fluir sobre el ligando unido en la superficie del chip durante 180 segundos, después de lo cual se pasó una solución en blanco sobre la superficie para permitir que el analito se disocie. Se repitió el mismo procedimiento durante cuatro veces adicionales usando una concentración creciente desde 0,74 hasta 20 nM para cada construcción. Los sensogramas resultantes se analizaron con el software del instrumento nativo para calcular las afinidades de unión de las construcciones (Figuras 10-14).

De acuerdo con sus datos de actividad del ensayo basado en células, todas las construcciones conservaron una afinidad de unión potente por IL-1RI. Las constantes de enlace calculadas (K<sub>D</sub>) a IL-1RI para RDB1813 (IL1Ra 2TR), RDB1814 (IL1Ra 4TR), RDB1826 (IL1Ra 6TR), RDB1815 (IL1Ra 8TR) y RDB1816 (IL1Ra 12TR) fueron 240 pM, 64 pM, 526 pM, 160 pM y 900 pM, respectivamente. Por lo tanto, las afinidades de unión de las construcciones

muciniladas son 4,6 veces (RDB1813), 1,2 veces (RDB1814), 10 veces (RDB1826), 3,1 veces (RDB1815) y 17,3 veces (RDB1816) más altas que las de IL-1Ra no modificada, cuya  $K_D$  se determinó que era 52 pM. Es importante señalar que la construcción con la afinidad más débil por IL-1RI (es decir, RDB1816) tuvo el mayor número de repeticiones en tandem de mucina en la serie (12TR). La pérdida de afinidad de RDB1816 se debió por completo a una tasa de asociación más lenta ( $K_a = 1,5 \times 10^5$ ) cuando se compara con IL-1Ra no modificada ( $K_a = 2,8 \times 10^6$ ), tal vez debido a una tasa de caída más lenta, ya que la tasa de disociación ( $K_d$ ) de RDB1816 ( $K_d = 1,4 \times 10^{-4}$ ) fue la misma que para la IL-1Ra no modificada ( $K_d = 1,5 \times 10^{-4}$ ) (Figura 14).

Ejemplo 5. Eficacia *in vivo* de RDB1816

La eficacia y duración de la acción de RDB1816 (IL-1Ra 12TR) se evaluó en el modelo de artritis inducida por anticuerpo anti-colágeno de ratón (CAIA). La IL-1Ra no modificada está activa en este modelo cuando se infunde continuamente a una velocidad de 6 mg/kg/h, pero no tiene efecto como dosis única de 20 mg/kg debido a su semivida extremadamente corta.

El diseño experimental para el modelo CAIA de ratón se representa en la Figura 15, con un n de 8 ratones por grupo. Brevemente, la artritis se inicia en los ratones mediante inyección intravenosa (IV) de un cóctel de anticuerpos anti-colágeno. Después de 3 días, la respuesta inflamatoria se reforzó con una inyección intraperitoneal (IP) de lipopolisacárido (LPS), mientras que, al mismo tiempo, los compuestos de prueba RDB1816 (20 mg/kg) y anakinra (IL-1Ra no modificada, 20 mg/kg), y una solución salina de control se administraron por vía subcutánea (SC). El volumen de la pata se midió a lo largo de múltiples días para evaluar el grado de inflamación.

Los resultados del experimento CAIA de ratón se representan en la Figura 16. El grupo tratado con anakinra no mostró reducción de la inflamación con respecto al control de la solución salina. Esto se debe a su corta semivida que da como resultado una baja exposición, ya que una infusión continua de anakinra es eficaz en este modelo. En marcado contraste, se observó una reducción significativa en el volumen de la pata en los ratones tratados con RDB1816 en relación tanto con los grupos tratados con solución salina como con los tratados con anakinra. Por lo tanto, la mucinilación aumentó suficientemente la exposición de la molécula de IL-1Ra para provocar un efecto farmacodinámico.

Ejemplo 6. Farmacocinética (PK) de RDB1815 y RDB1816

Se realizó un estudio farmacocinético en ratas para determinar la semivida de dos construcciones de polipéptido de fusión IL-1Ra-mucina: RDB1815 y RDB1816. Se administró una dosis única de RDB1815 por vía subcutánea (5,6 mg/kg) o por vía intravenosa (2,1 mg/kg) y se administró una dosis única de RDB1816 por vía subcutánea (6,4 mg/kg) o por vía intravenosa (2,4 mg/kg), con un n = 3 ratas por grupo de dosificación. La sangre se recogió en diversos puntos de tiempo durante 6 días y se analizó para determinar IL-1Ra mediante ELISA.

A partir de los datos de farmacocinética (Figura 17), se calcularon semividas de 17,9 h y 13,9 h para RDB1815 y RDB1816, respectivamente cuando se administraba por vía intravenosa, y 11,0 h y 8,0 h, respectivamente cuando se administraron por vía SC. Esto representa una extensión de la semivida entre 10 veces y 14 veces respecto a los valores descritos para el control de IL-1Ra no modificada (anakinra). Consecuentemente, la exposición tanto de RDB1815 como de RDB1816 se incrementa drásticamente, de acuerdo con la eficacia observada en el modelo CAIA de ratón.

Ejemplo 7. Peso molecular de la construcción mucina-exendina-4 RDB2203

RDB2203 se caracterizó usando SDS/PAGE y filtración analítica en gel en una columna Superdex 200. Por SDS/PAGE, el peso molecular aparente de RDB2203 es de aproximadamente 45 kD, aproximadamente el doble del peso molecular del polipéptido calculado de 22,8 kD, consistente con un alto nivel de glicosilación (Figura 18: marcadores moleculares a la izquierda). Mediante filtración analítica en gel, el peso molecular aparente de RDB2203 es de 120 kD (pico único entre los patrones de 158 kD y 75 kD), debido al gran radio hidrodinámico impartido por el dominio mucina altamente glicosilado (Figura 19).

Ejemplo 8. Bioactividad de RDB2203

La capacidad de RDB2203 para agonizar el receptor GLP-1 se midió usando el ensayo de AMPc del receptor GLP-1 DiscoveRx PathHunter eXpress. El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante. Los resultados indican que RDB2203 es un potente agonista del receptor GLP-1, lo que demuestra una EC<sub>50</sub> de 1,5 nM, que es aproximadamente 21 veces menos potente que la de la exendina-4 no modificada (EC<sub>50</sub> de 0,07 nM) (Figura 20).

Ejemplo 9. Perfil farmacocinético de RDB2203

RDB2203 se administró en ratas por vía intravenosa a 0,65 mg/kg y por vía subcutánea a 0,65 mg/kg y 7,0 mg/kg. Con respecto a la exendina-4<sup>1</sup> no-mucinilada, RDB2203 mostró un aumento en la semivida (2,0 h frente a 0,5 h, iv) y un aclaramiento reducido (74 ml/h/kg frente a 200 ml/h/kg, iv), lo que resultó en un aumento de la exposición total [<sup>1</sup>

Ai, G., et al.; Pharmacokinetics of exendin-4 in Wistar rats; Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences; 17 (2008 6-10] (Figura 21). Por vía subcutánea, RDB2203 también mostró una biodisponibilidad mejorada, >95 % con respecto al 65 % para la exendina-4 no modificada (Figura 21).

5 La bibliografía de patentes y científica a las que se hace referencia en la presente memoria establecen el conocimiento que está disponible para los expertos en la materia.

10 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que las 15 realizaciones descritas en la presente memoria no son mutuamente excluyentes y que las características de las diversas realizaciones se pueden combinar en su totalidad o en parte de acuerdo con la invención.

15 Listado de secuencias

15 <110> ALKERMES, INC.

20 <120> POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN UNA PROTEÍNA ACTIVA UNIDA A UN POLIPÉPTIDO CON DOMINIO MUCINA

25 <130> 4000.3058 WO

30 <140>

<141>

35 <150> 61/778.575

<151> 13-03-2013

40 <150> 61/778.812

<151> 13-03-2013

45 <150> 61/723.081

<151> 06-11-2012

50 <150> 61/657.264

<151> 08-06-2012

<150> 61/657.378

<151> 08-06-2012

55 <150> 61/657.285

<151> 08-06-2012

<160> 28

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 209

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

65 <400> 1

Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe  
 1 5 10 15

Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln  
 20 25 30

Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys  
 35 40 45

Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His  
 50 55 60

Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys  
 85 90 95

Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr  
 100 105 110

Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met  
 115 120 125

Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val  
 130 135 140

Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Gly Gly Ser  
 145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile  
 165 170 175

Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro  
 180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly Ser Ser His His His His His  
 195 200 205

His

<210> 2  
 5 <211> 633  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 667 558 T3

<400> 2

tccgctcgac gacccctctgg gcgaaaatct tctaaaatgc aggccctccg gatttgggat	60
gtgaatcaga aaactttta cctgaggaac aaccagctgg tcgctggata cctgcaggga	120
ccaaacgtga atctggagga gaaaatcgac gtcgtcccaa tcgaacctca cgctctgttt	180
ctggaaatcc atggcggcaa aatgtgtctg tcctgtgtga aatctggcga cgagactaga	240
ctgcagctgg aggctgtgaa tatcaccgac ctgtctgaga atcgtaaaca ggacaaacgc	300
tttgccttta tccgctccga tagtggacca acaacctctt tcgaatctgc tgcttgcct	360
ggatggtttc tgtgtaccgc tatggaggcc gatcagcctg tgtctctgac caatatgcc	420
gatgagggag tcatggtgac aaaattctac tttcaggagg atgagggcgg aggccgttct	480
gctagtagcg agtccctctgc ttatccgat ggacctcacc ccgtgattac cgaatcccgaa	540
gcttcccg aatccctctgc ctatccgac ggccccacacc ctgtcatcac tgagagccgt	600
ggttcatcac accaccatca tcaccactag tga	633

5

<210> 3  
<211> 254  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

15

Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe  
 1 5 10 15

Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln  
 20 25 30

Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys  
 35 40 45

Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His  
 50 55 60

Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys  
 85 90 95

Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr  
 100 105 110

Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met  
 115 120 125

Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val  
 130 135 140

Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Gly Gly Gly Ser  
 145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile  
 165 170 175

Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro  
 180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser  
 195 200 205

Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser  
 210 215 220

Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val  
 225 230 235 240

Ile Thr Glu Ser Arg Gly Ser Ser His His His His His His  
 245 250

5  
 <210> 4  
 <211> 768  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 4

tccgctcgac gacttctgg	60
gcgaaaatct tctaaaatgc	
aggccttccg gatttggat	
gtgaatcaga aaactttta	120
cctgaggaac aaccagctgg	
tgcgtggata cctgcaggga	
ccaaacgtga atctggagga	180
gaaaatcgac gtgcgtccaa	
tgcgaacctca cgctctgtt	
ctgggaatcc atggcggcaa	240
aatgtgtctg tctgtgtga	
aatctggcga cgagactaga	
ctgcagctgg aggctgtgaa	300
tatcaccgac ctgtctgaga	
atcgtaaaca ggacaaacgc	
tttgccctta tccgctccga	360
tagtggacca acaaccttt	
tcgaatctgc tgcttgcct	
ggatggtttc tgtgtaccgc	420
tatggaggcc gatcagcctg	
tgtctctgac caatatgccc	
gatgagggag tcatggtgac	480
aaaattctac tttcaggagg	
atgagggcgg aggccgttct	
gcttagtagcg agtcctctgc	540
ttcttccgat ggacctcacc	
ccgtgattac cgaatcccg	
gcttcttccg aatcttctgc	600
ctcttccgac ggcccacacc	
ctgtcatcac tgagagccgt	
ggtggcggtg gatctgctag	660
tagtgaatca tctgctagta	
gtgacggccc acaccccg	
attactgaga gtcgtgcctc	720
ttccgaatca tctgctagta	
gtgacggacc tcaccccg	
atcaactgagt cccgtggctc	768
atcacaccac catcatcacc	
actagtga	

15  
 <210> 5  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 5

ES 2 667 558 T3

Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe  
1 5 10 15

Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln  
20 25 30

Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys  
35 40 45

Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His  
50 55 60

Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys  
85 90 95

Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr  
100 105 110

Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met  
115 120 125

Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val  
130 135 140

Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Gly Gly Ser  
145 150 155 160

Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro  
165 170 175

Ser Arg Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val  
180 185 190

Ile Thr Pro Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ser Glu Ser Ser Ala  
195 200 205

Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro Ser Arg Ala Ser Glu  
210 215 220

Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro Ser Arg  
225 230 235 240

Ala Gly Gly Gly Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro

245

250

255

His Pro Val Ile Thr Pro Ser Arg Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser  
 260 265 270

Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro Ser Arg Ala Gly Gly Gly Gly  
 275 280 285

Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 290 295

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 897

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

&lt;400&gt; 6

tccggcaggc	ggccttcggg	caggaaaagc	agcaagatgc	agggcttccg	gatctggac	60
gtgaaccaga	agaccttcta	cctgcggAAC	aaccagctgg	tggccggcta	tctgcaaggc	120
cccaacgtca	acctggagga	gaagatcgac	gtatgtcccta	tgcggcctca	cggccgttcc	180
ctcggcatcc	acggcgaaaa	gatgtgcctg	agctgcgtga	agtccggcga	cgagacaagg	240
ctccagctcg	aggccgtgaa	tatcaccgac	ctgtccgaga	accggaaagca	ggacaagcgg	300
ttcgccctca	tcaggtccga	cagccgcct	accacctcct	tcgaatccgc	cgcttgcct	360
ggctggtttc	tgtgtaccgc	tatggaggcc	gaccagcctg	tgtccctcac	caacatgcot	420
gacgagggcg	tgtatggtgac	caagttctac	ttccaggagg	acgaaggagg	cgccggctcc	480
agcgaatcca	gcgcctccag	cgatggcccc	catcctgtca	tcacccctag	cagggcctcc	540
gaaagctccg	ccagcagcga	tggacctcat	cctgtcatta	cacctagcag	ggctggagga	600
ggaggcagct	ccgagtcctag	cgctagctcc	gacggacccc	accccggtat	tacaccctcc	660
cgggcttccg	agagcagcgc	ttccagcgat	ggacctcatac	ccgtgatcac	cccttccagg	720
gctggcggag	gcggctccag	cgagagcagc	gcctccagcg	acggccccca	ccctgtgatt	780
acaccttccc	gggccagcga	gagctccgct	agcagcgatg	gaccccatcc	cgtgatcaca	840
cccaagcaggg	ccggaggcgg	aggaagcgat	tacaaggacg	acgacgacaa	gtagtga	897

15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 344

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 667 558 T3

<400> 7

Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe  
1 5 10 15

Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln  
20 25 30

Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys  
35 40 45

Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His  
50 55 60

Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys  
85 90 95

Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr  
100 105 110

Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met  
115 120 125

Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val  
130 135 140

Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Gly Gly Gly Ser  
145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile  
165 170 175

Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro  
180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser  
195 200 205

Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser  
210 215 220

Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val  
225 230 235 240

Ile Thr Glu Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser  
245 250 255

Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser  
260 265 270

Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu  
275 280 285

Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser  
290 295 300

Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser  
305 310 315 320

Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly  
325 330 335

Ser Ser His His His His His  
340

<210> 8

<211> 1038

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10 <400> 8

tccgctcgac gaccttctgg gcgaaaatct tctaaaatgc aggccctccg gatttgggat	60
gtgaatcaga aaactttta cctgaggaac aaccagctgg tcgctggata cctgcaggga	120
ccaaacgtga atctggagga gaaaatcgac gtcgtcccaa tcgaacctca cgctctgttt	180
ctggaaatcc atggcggcaa aatgtgtctg tcctgtgtga aatctggcga cgagactaga	240
ctgcagctgg aggctgtgaa tatcaccgac ctgtctgaga atcgtaaaca ggacaaacgc	300
tttgcctta tccgctccga tagtggacca acaaccttgc tcgaatctgc tgcttgcct	360
ggatggtttc tgtgtaccgc tatggaggcc gatcagcctg tgtctctgac caatatgccc	420
gatgagggag tcatggtgac aaaattctac tttcaggagg atgagggcgg aggccggttct	480
gctagtagcg agtcctctgc ttcttccgat ggacctcacc ccgtgattac cgaatcccgaa	540
gcttcttccg aatcttctgc ctcttccgac ggcccacacc ctgtcatcac tgagagccgt	600
ggtggcggtg gatctgctag tagtgaatca tctgctagta gtgacggccc acaccccgta	660
attactgaga gtcgtgcctc ttcgaatca tctgctagta gtgaoggacc tcaccccgta	720
atcaactgagt cccgtggcgg tggcggttcc gttcatctg aatcttccgc ttcatccgat	780
ggtccccatc ctgtcattac cgaatctcggt gcctctagcg aatcatccgc ttcttagtgac	840
ggtccccacc ctgtcattac tgaatcccgaa ggccggcggtg gatctgttc ttccgaatca	900
tctgcttcta gtgacggacc acacccctgtc attaccgaga gtagggcttc atctgaatct	960
tccgcttcat cccacggacc acatctgtg attactgaat cacgaggctc atcacaccac	1020
catcatcacc actagtga	1038

<210> 9  
 <211> 434  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético  
 10 <400> 9

Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe  
1 5 10 15

Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln  
20 25 30

Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys  
35 40 45

Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His  
50 55 60

Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys  
85 90 95

Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr  
100 105 110

Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met  
115 120 125

Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val  
130 135 140

Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Gly Gly Gly Ser  
145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile

## ES 2 667 558 T3

165

170

175

Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro  
180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser  
195 200 205

Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser  
210 215 220

Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val  
225 230 235 240

Ile Thr Glu Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser  
245 250 255

Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser  
260 265 270

Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu  
275 280 285

Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser  
290 295 300

Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser  
305 310 315 320

Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly  
325 330 335

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro  
340 345 350

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser  
355 360 365

Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly Gly Gly  
370 375 380

Ser Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val  
385 390 395 400

Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly  
405 410 415

Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Gly Ser Ser His His His His  
 420 425 430

**His His**

<210> 10

<211> 1308

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10 <400> 10

tccgctcgac	gaccttotgg	gcgaaaatct	tctaaaatgc	aggccttcgg	gatttgggat	60
gtgaatcaga	aaactttta	cctgaggaac	aaccagctgg	tcgctggata	cctgcaggga	120
ccaaacgtga	atctggagga	gaaaatcgac	gtcgccccaa	tcgaacctca	cgctctgttt	180
ctgggaatcc	atggcggcaa	aatgtgtctg	tactgtgtga	aatctggcga	cgagactaga	240
ctgcagctgg	aggctgtgaa	tatcaccgac	ctgtctgaga	atcgtaaaca	ggacaaaacgc	300
tttgcctta	tccgctccga	tagtggacca	acaacctctt	tcgaatctgc	tgcttgccct	360
ggatggtttc	tgtgtaccgc	tatggaggcc	gatcagccctg	tgtctctgac	caatatgcc	420
gatgagggag	tcatggtgac	aaaattctac	tttcaggagg	atgagggcgg	aggcggttct	480
gctagtagcg	agtccctctgc	ttcttccgat	ggacctcacc	ccgtgattac	cgaatcccga	540
gcttattccg	aatcttctgc	ctcttccgac	ggccccacacc	ctgtcatcac	tgagagccgt	600
ggtggcggtg	gatctgctag	tagtgaatca	tctgctagta	gtgacggccc	acaccccg	660
attactgaga	gtcgtgcata	ttccgaatca	tctgctagta	gtgacggacc	tcaccccg	720
atcactgagt	cccgtggcgg	tggcggttcc	gcttcatctg	aatcttccgc	ttcatccgat	780
ggtccccatc	ctgtcattac	cgaatctcg	gctctagcg	aatcatccgc	ttctagtgc	840
ggtccccacc	ctgtcattac	tgaatcccga	ggcgccggtg	gatctgcttc	ttccgaatca	900
tctgcttcta	gtgacggacc	acaccctgtc	attaccgaga	gtagggcttc	atctgaatct	960
tccgcttcat	ccgacggacc	acatcctgtg	attactgaat	cacgaggcgg	aggaggctcc	1020
gcttctagcg	aatcatctgc	ctctagtgc	ggtccccatc	ccgtcatcac	tgaatctcg	1080
gcatcatctg	agtcatctgc	ttctagtgc	ggccccacacc	ctgtgattac	tgagtcccg	1140
ggaggcggcg	gttctgcctc	ttctgaatcc	tctgcttctt	ccgatggccc	acaccctgtc	1200
attaccgaat	cccgtgctag	tagtggatca	tctgctctca	gtgacggacc	tcacccctgt	1260
attaccgaat	ctcgaggatc	atcacaccac	catcatcacc	actagtga		1308

15 <210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 11

Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala
1				5					10				15		

Pro	Asp	Thr	Arg
		20	

5 &lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

10 &lt;400&gt; 12

Ile	Thr	Thr	Thr	Thr	Val	Thr	Pro	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	
1					5				10			15	

Gln	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro
			20			

15 &lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

20 &lt;400&gt; 13

Ile	Thr	Thr	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	His	Asp	Thr	Pro	Ser	Phe	Thr	Ser
1				5				10				15			

**Ser**

25 &lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 14

Ala	Thr	Pro	Leu	Pro	Val	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Gly	His
1				5					10			15			

30 &lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

35 <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 15

Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro
1				5			

40 &lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 16

Ala	Thr	Gly	Ser	Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly	Thr	Thr	His
1					5					10				15	

Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Pro	Thr		
				20					25					

5 &lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

10 &lt;400&gt; 17

Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Ala	Thr	Thr	Gln	Ala	Pro	Pro
1						5				10				15	

Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Pro	Glu
			20			

15 &lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

20 &lt;400&gt; 18

Glu	Glu	Ser	Thr	Thr	Val	His	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Thr	Gly	Thr	Ala
1					5				10			15			

Leu	Phe	Pro
-----	-----	-----

25 &lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 59

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 19

Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Pro	Ala	Glu	Gly	Thr	Ser	Met	Pro	Thr	Ser	Thr
1						5			10			15			

Tyr	Ser	Glu	Gly	Arg	Thr	Pro	Leu	Thr	Ser	Met	Pro	Val	Ser	Thr	Thr
					20			25				30			

Leu	Val	Ala	Thr	Ser	Ala	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Thr	Thr	Pro	Val	Asp
					35			40				45			

Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala
				50				55		

30

5 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 20

**Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro**  
 1                   5                   10                   15

**Ser Arg Ala**

10 <210> 21  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 21

**Ala Thr Asn Ser Glu Ser Ser Thr Val Ser Ser Gly Ile Ser Thr**  
 1                   5                   10                   15

20 <210> 22  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 22

**Val Pro Thr Thr Thr Thr**  
 1                   5

30 <210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

**Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala Thr Glu Ala**  
 1                   5                   10

35 <210> 24  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

45 <400> 24

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1															15
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
															30
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	
	35						40							45	
Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	His	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Arg
50															60
Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	His	Pro	Val	Ile
65															80
Thr	Glu	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Ala	
	85						90							95	
Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	His	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser
	100						105							110	
Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	His	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser
115															125
Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	
	130						135							140	
Gly	Pro	His	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser
145															160
Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	His	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Arg	Gly	Gly
	165						170							175	
Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Pro	His
	180						185							190	
Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser
195															205
Asp	Gly	Pro	His	Pro	Val	Ile	Thr	Glu	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	
	210						215							220	
His	His	His	His	His	His										
	225						230								

<210> 25  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(6)  
<223> Cualquier aminoácido

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(9)  
<223> Cualquier aminoácido

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(12)  
<223> Cualquier aminoácido

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> Cualquier aminoácido

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(18)  
<223> Cualquier aminoácido

<400> 25

Glu Glu Ser Xaa Xaa His Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Thr Xaa Thr Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Pro

35 <210> 26  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 26

Gly Val Thr Gly Thr Thr Gly Pro Ser Ala  
1 5 10

45 <210> 27  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 27

Gly Gly Gly Gly  
1

<210> 28  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 28

10

**Gly Gly Gly Gly Ser**

**1**

**5**

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido con dominio mucina unido a al menos una proteína activa mediante un enlazador opcional en la que el polipéptido con dominio mucina está glicosilado y comprende la SEQ ID NO: 20 o cualquier secuencia de aminoácidos homóloga a la misma con al menos un 90 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, en la que la proteína activa es IL-1Ra o exendina-4 o cualquier secuencia de aminoácidos idéntica a la misma con al menos 90 % de identidad de secuencia; y en la que la semivida de la proteína de fusión es dos veces mayor en comparación con la semivida de la proteína activa correspondiente que no está fusionada con el polipéptido con dominio mucina.
- 5
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el polipéptido con dominio mucina comprende al menos dos repeticiones en tandem de SEQ ID NO: 20.
- 10
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el peso molecular aparente de la proteína de fusión es mayor que el peso molecular calculado de la proteína de fusión.
- 15
4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende los aminoácidos 4-200 de SEQ ID NO: 1.
- 20
5. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende los aminoácidos 4-245 de SEQ ID NO: 3.
- 25
6. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende los aminoácidos 4-283 de SEQ ID NO: 5.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende los aminoácidos 4-335 de SEQ ID NO: 7.
- 30
8. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende los aminoácidos 4-425 de SEQ ID NO: 9.
9. Una proteína de fusión de la reivindicación 1 que comprende los aminoácidos 1-224 de secuencia de la SEQ ID NO: 24.
- 35
10. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 10, que comprende además preferiblemente una secuencia reguladora recombinante operativamente unida a la secuencia de polinucleótidos.
- 40
12. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 11.
13. Un método para aumentar la semivida sérica de una proteína activa terapéutica que comprende:
- 45
- a) proporcionar una proteína activa terapéutica, en el que la proteína activa es IL-1Ra o exendina-4 o cualquier secuencia de aminoácidos idéntica a la misma con al menos 90 % de identidad de secuencia;
- b) unir la proteína activa terapéutica a un polipéptido con dominio mucina, que comprende la SEQ ID NO: 20 para formar una proteína de fusión; y
- 50
- c) medir la semivida sérica de la proteína de fusión después de la administración de una dosis terapéuticamente efectiva a un sujeto y determinar que la semivida ha aumentado en dos veces en comparación con la proteína terapéutica correspondiente sola cuando también se administra a una dosis terapéutica comparable.
- 55
14. El método de la reivindicación 13, en el que el polipéptido con dominio mucina comprende al menos dos repeticiones en tandem de SEQ ID NO: 20.
15. El método de la reivindicación 13, en el que la etapa de unión incluye unir la proteína activa a un polipéptido con dominio mucina a través de un enlazador aminoácido.
- 60
16. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 para su uso en medicina.

18. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 17 para uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno seleccionado de: diabetes tipo 2, hemofilia, neutropenia, anemia, trombocitopenia, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artrosis.

ES 2 667 558 T3

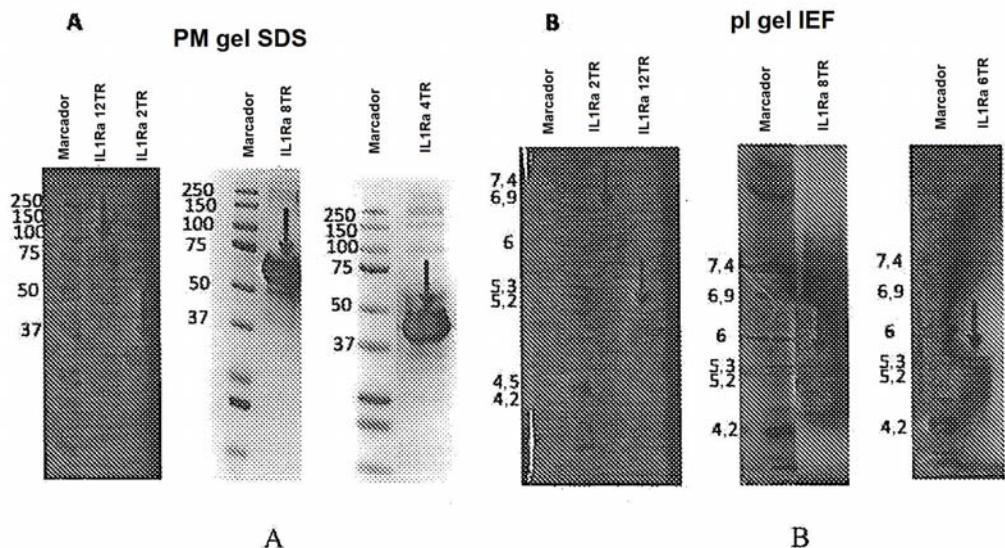


FIG. 1

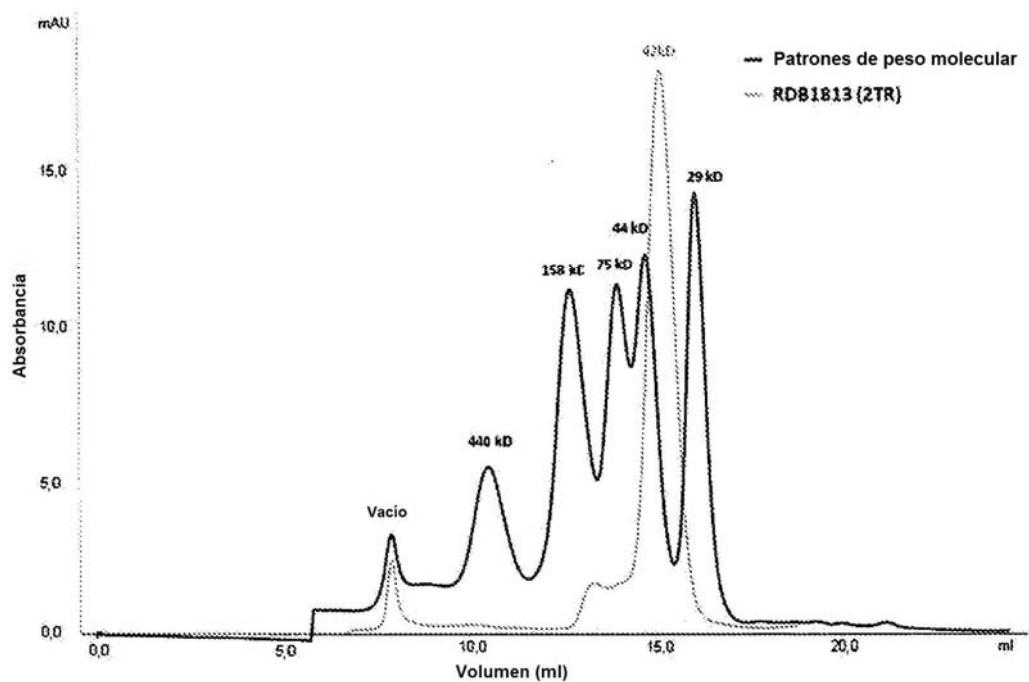


FIG. 2

# ES 2 667 558 T3

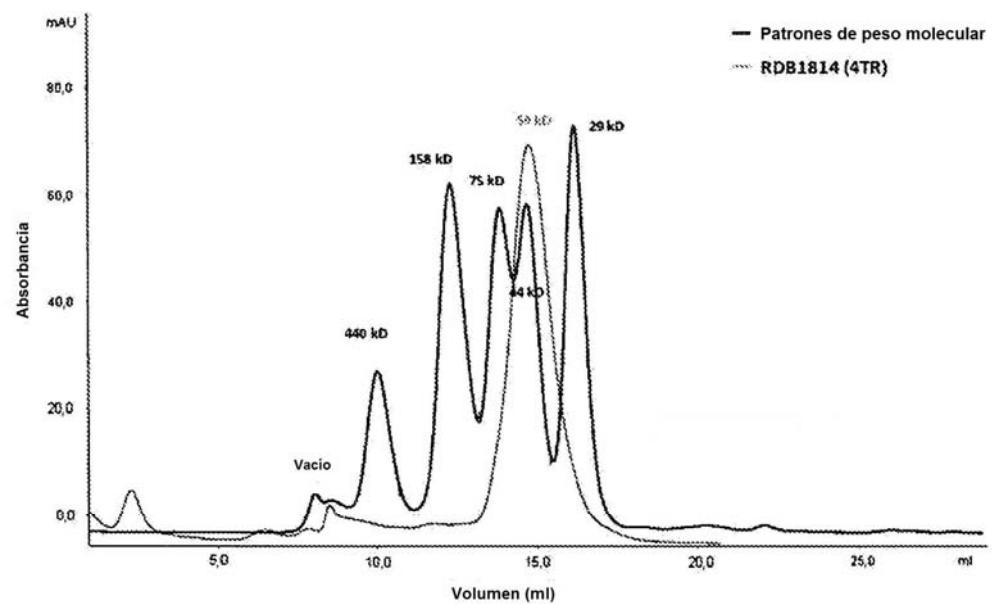


FIG. 3

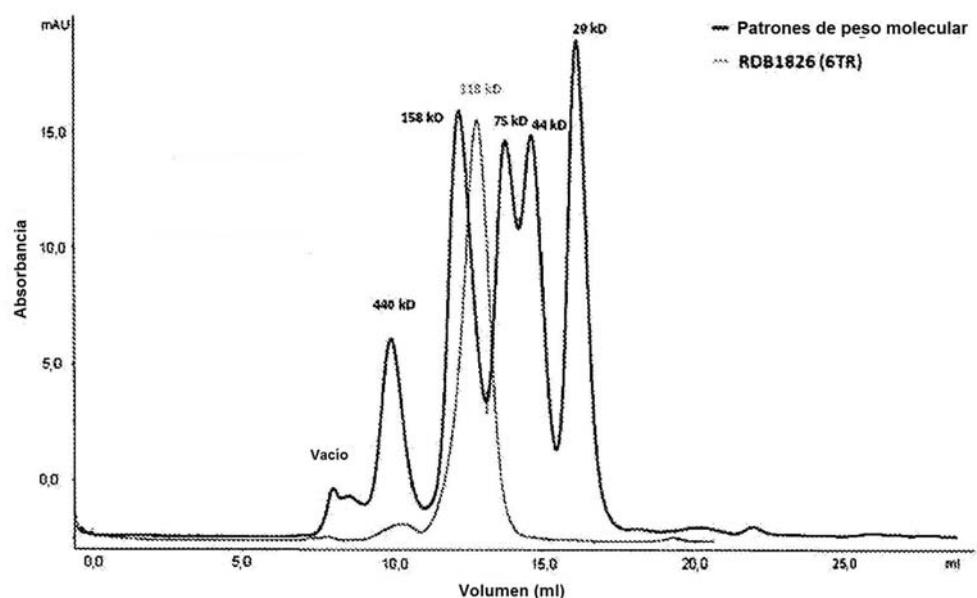


FIG. 4

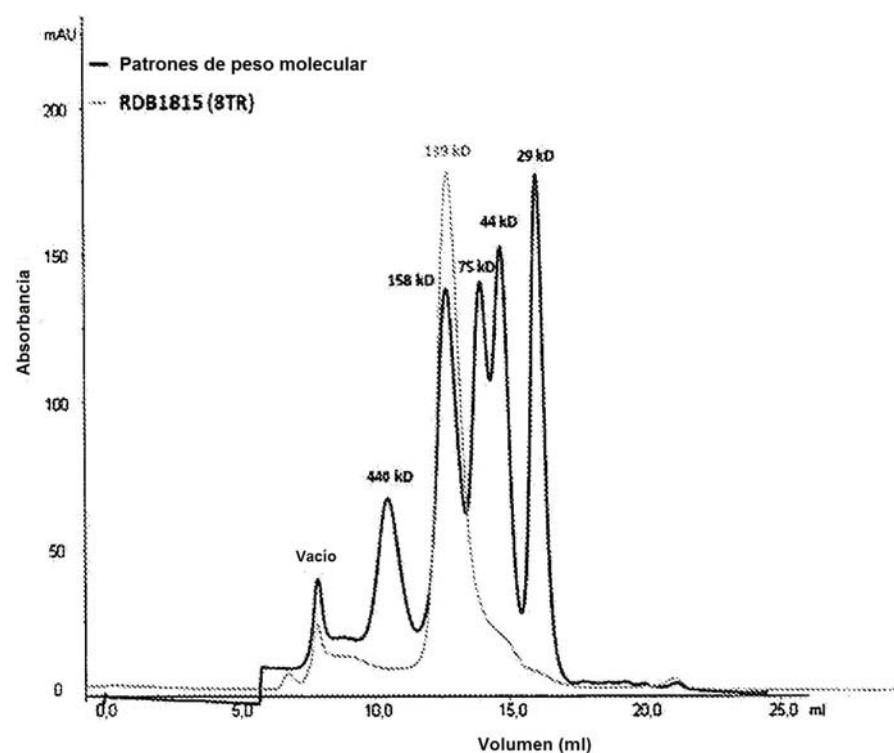


FIG. 5

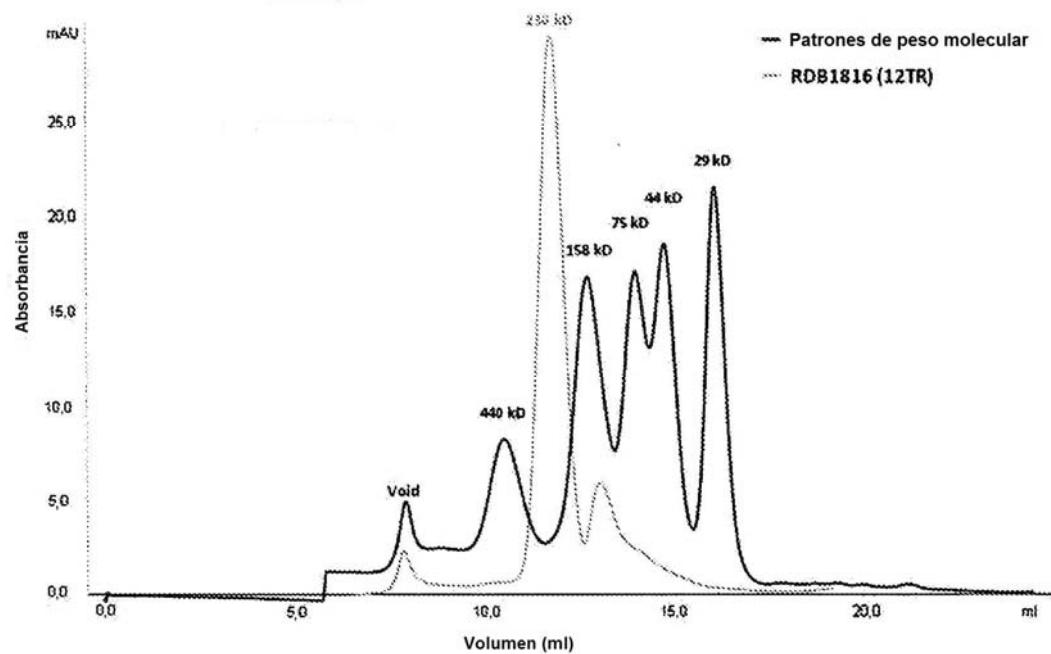


FIG. 6

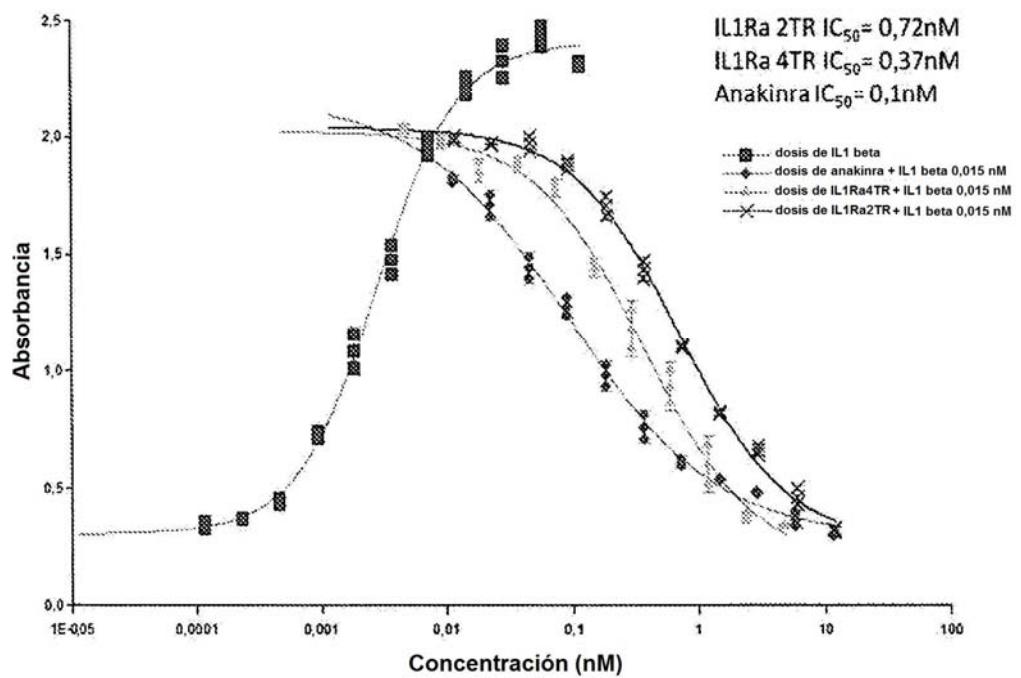


FIG. 7

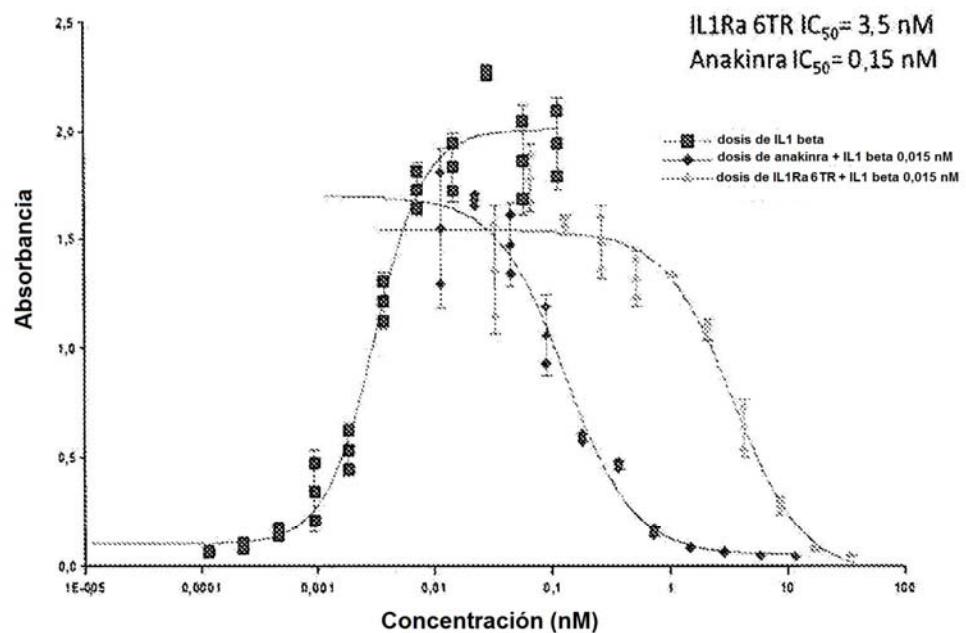


FIG. 8

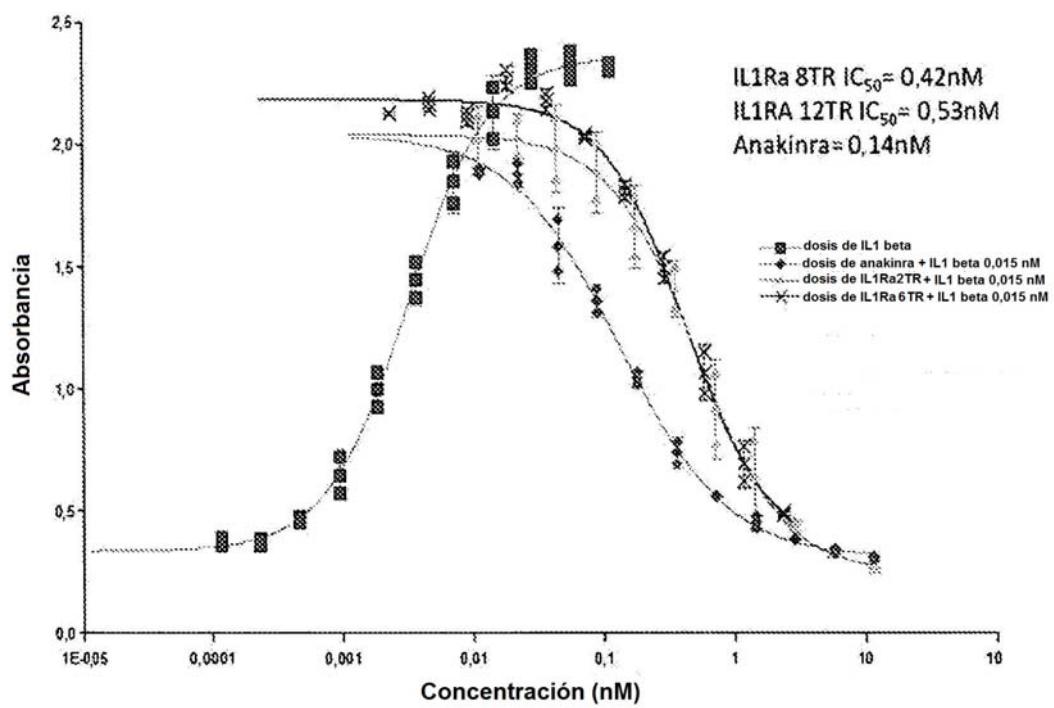


FIG. 9

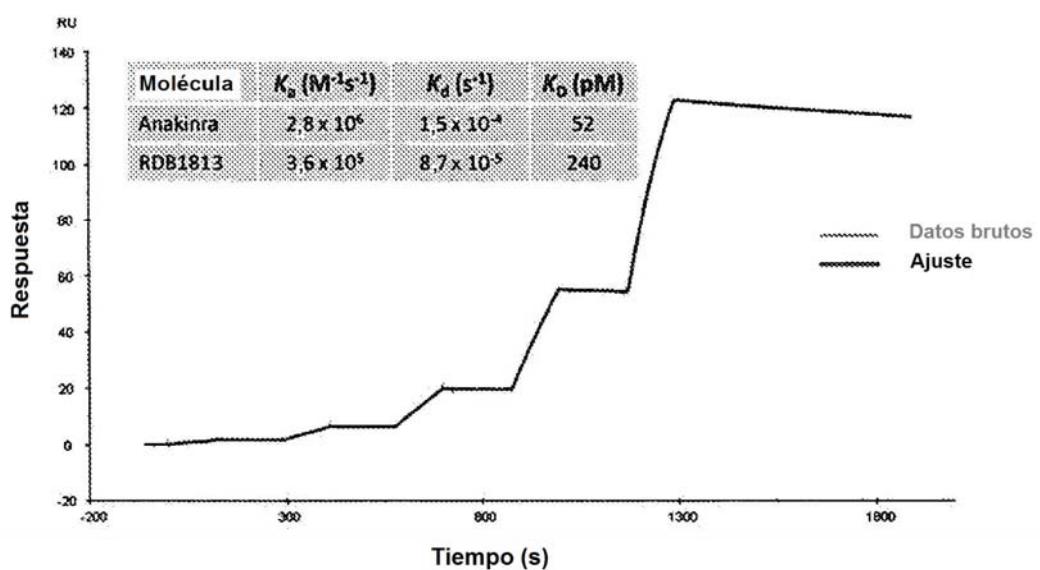


FIG. 10

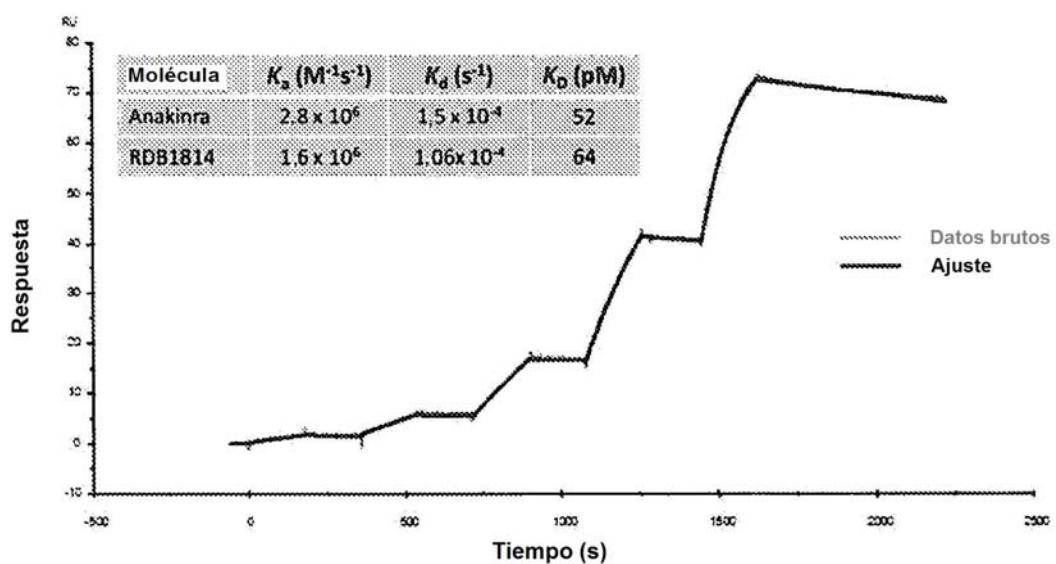


FIG. 11

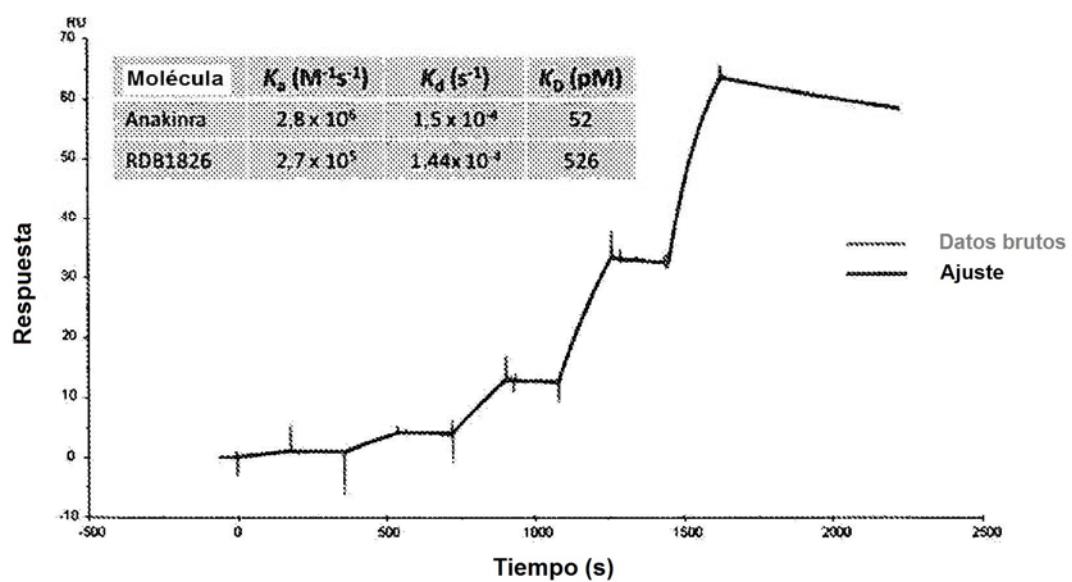


FIG. 12

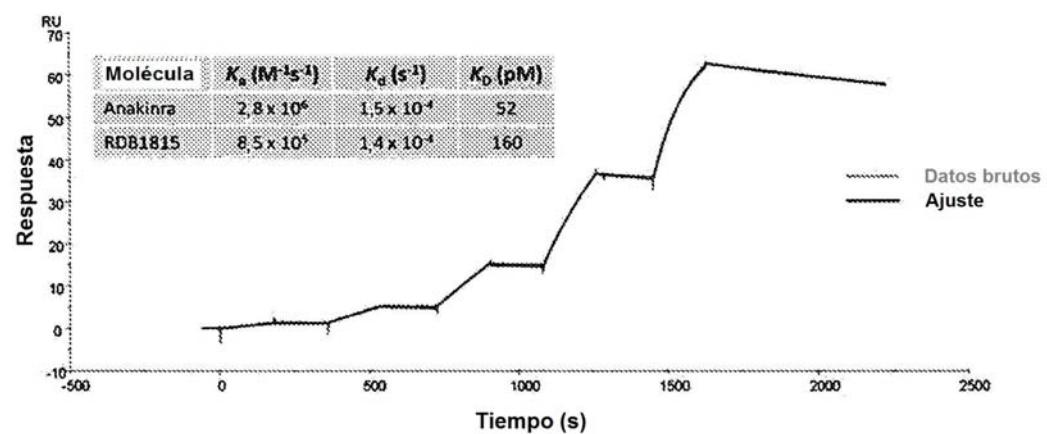


FIG. 13

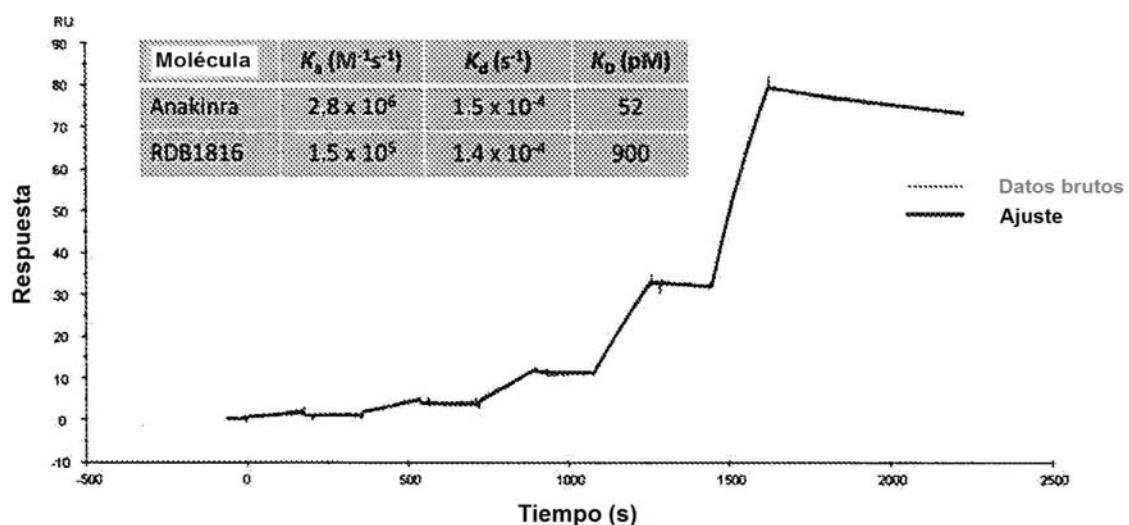
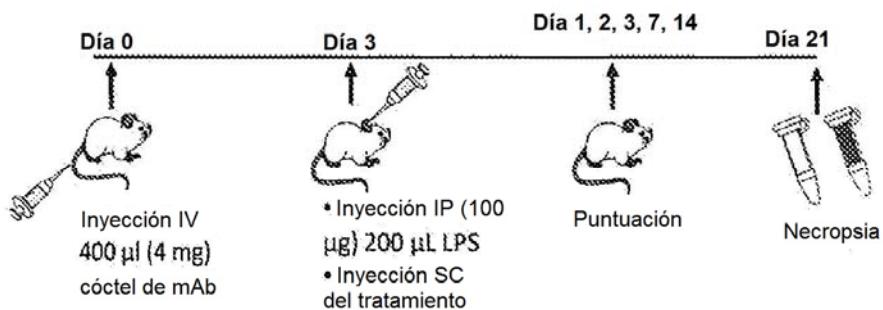


FIG. 14



Cóctel de anticuerpos (IV)					Proteína IL-1Ra				
Grupo	Dosis (mg)	Conc (mg/ml)	Vol. dosis (µl)	Dosis (mg)	Conc (mg/ml)	Vol.dosis (µl)	Dosis (mg/kg)	Conc (mg/ml)	Vol.dosis (ml/kg)
Solución salina	4	10 mg/ml	400	0,1	0,5	200	0	0	1
Anakinra	4	10 mg/ml	400	0,1	0,5	200	20	150	0,13
12TR [RDB1816]	4	10 mg/ml	400	0,1	0,5	200	20	0,5	40

FIG. 15

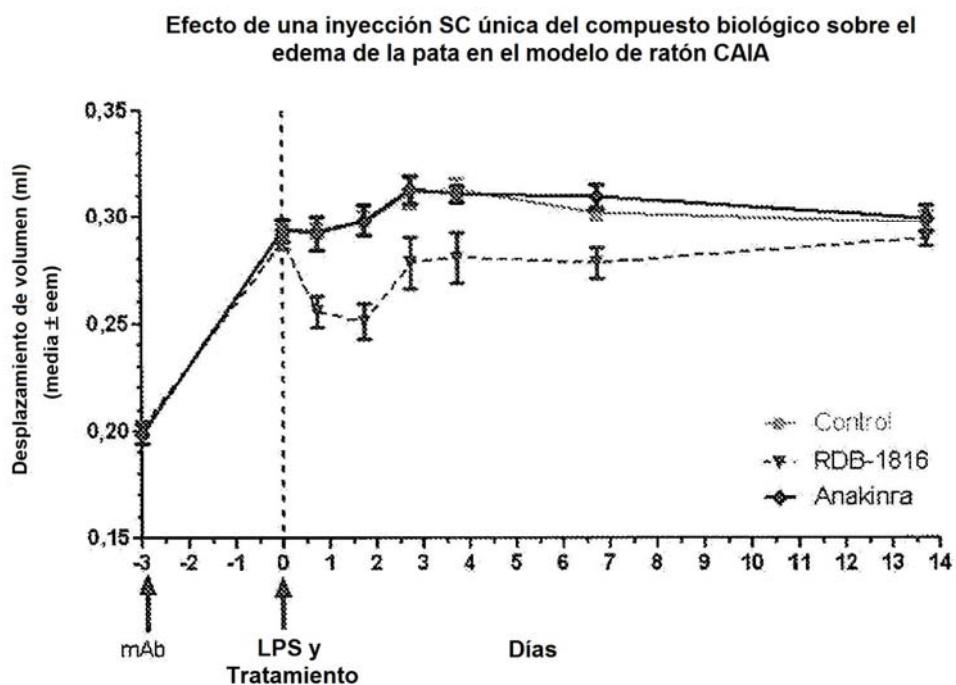
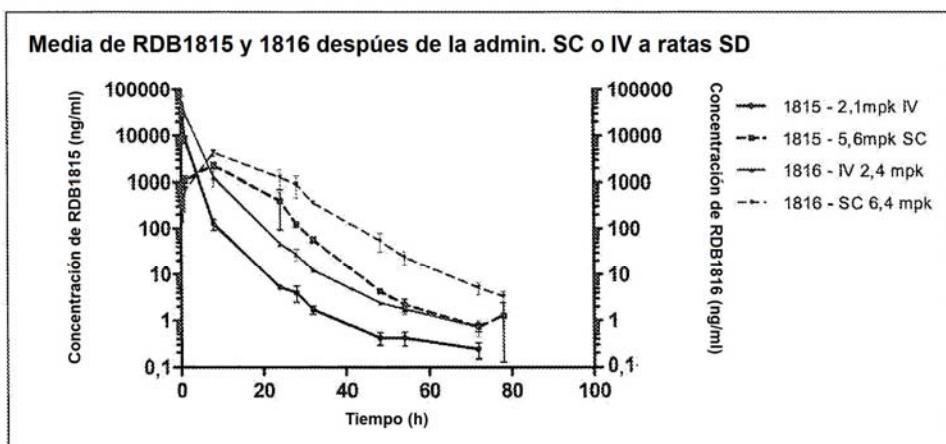


FIG. 16



	IV			SC			%F
	T <sub>1/2</sub> (h)	Cl (ml/min/kg)	AUCINF(h*ng/ml)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>1/2</sub> (h)	AUCINF(h*ng/ml)	
Anakinra	1,25	9	5890	4400	0,8	16300	94
RDB-1815	17,9	0,7	50300	2277	11,0	35633	27
RDB-1816	13,9	0,25	166000	4275	8,0	75550	17

FIG. 17

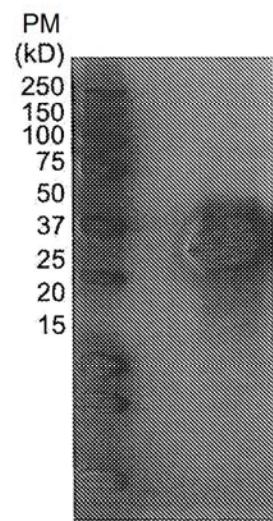


FIG. 18

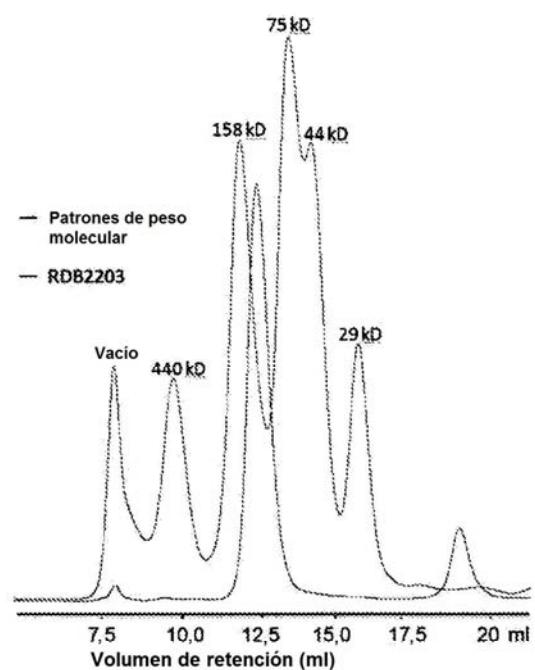


FIG. 19

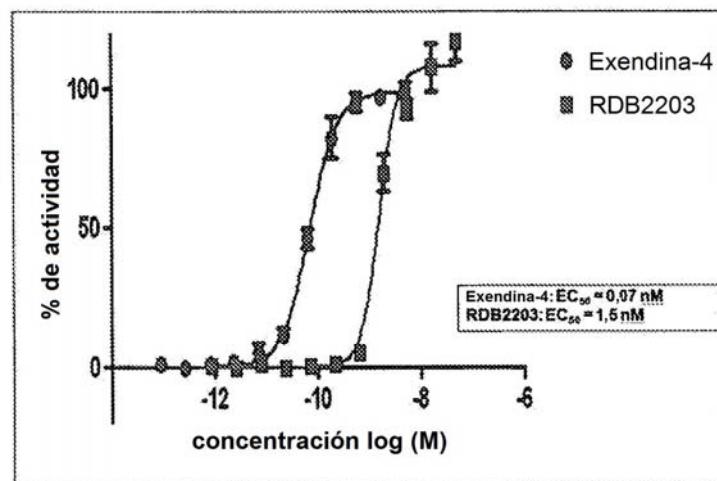


FIG. 20

## FC de LSC 12-261 (exendina-4-mucina) en rata: Media

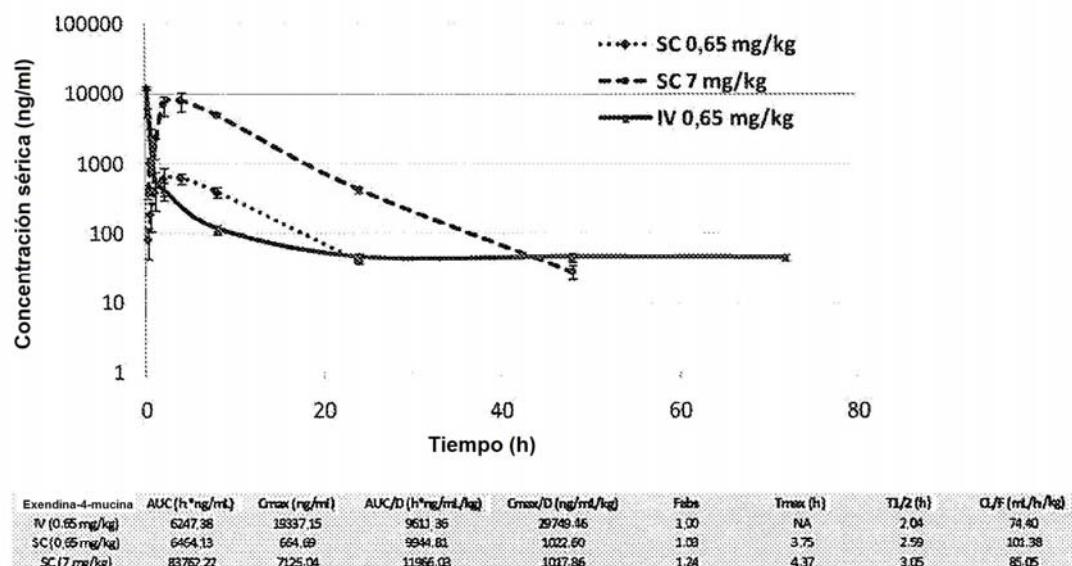


FIG. 21