

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 443**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/19** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2014 PCT/KR2014/000901**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14119956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2014 E 14746164 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 2951284**

54 Título: **Transformante de levadura recombinante y proceso de preparación del fragmento Fc de inmunoglobulina mediante el empleo del mismo**

30 Prioridad:

**31.01.2013 KR 20130011471**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.10.2021**

73 Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)  
214, Muha-ro, Paltan-myeon  
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, JIN-SUN;  
HUH, YONG HO;  
OH, EUH LIM;  
KIM, MIN YOUNG;  
JUNG, SUNG YOUB y  
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

ES 2 865 443 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

Transformante de levadura recombinante y proceso de preparación del fragmento Fc de inmunoglobulina mediante el empleo del mismo

## [Campo técnico]

La presente descripción se refiere a un transformante de levadura recombinante y a un proceso para preparar un fragmento Fc de inmunoglobulina mediante el uso del mismo. Más particularmente, la presente descripción se refiere a un transformante preparado mediante la introducción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento Fc de inmunoglobulina humana en la levadura *Pichia sp.*, un método para producir un fragmento Fc de inmunoglobulina, que comprende cultivar el transformante y recuperar el fragmento Fc de inmunoglobulina a partir del cultivo, y un fragmento Fc de inmunoglobulina, preparado mediante el método anterior para su uso como portador de fármacos.

## [Antecedentes de la técnica]

Con el avance de la bioingeniería y la biotecnología, se han desarrollado muchos polipéptidos bioactivos (proteínas) y medicamentos peptídicos como opciones terapéuticas para diversas enfermedades. Sin embargo, debido a su baja estabilidad, tales polipéptidos o medicamentos peptídicos se desnaturalizan fácilmente y, por tanto, son altamente propensos al aclaramiento renal o hepático. Por consiguiente, los medicamentos proteicos que comprenden polipéptidos como ingredientes medicinalmente activos sufren la desventaja de la administración necesariamente frecuente a los pacientes para mantener los niveles séricos y títulos apropiados de los mismos. Por lo tanto, es esencial para el desarrollo de los medicamentos proteicos permitir que estos se mantengan en un nivel adecuado en el cuerpo sin una administración frecuente.

Para resolver estos problemas, se ha dedicado un gran esfuerzo a mejorar la estabilidad sérica de los fármacos proteicos y en mantener un nivel alto de concentración del fármaco en la sangre durante un período de tiempo prolongado para maximizar la eficacia farmacéutica de los fármacos, de este modo se ha intentado mejorar el cambio en las formulaciones de la proteína, la fusión con otras proteínas o la unión a un polímero. Uno de los métodos más favorecidos en los años recientes se ha centrado en la fusión de inmunoglobulinas a las proteínas.

Muchos intentos se han realizado para aumentar la estabilidad de los medicamentos proteicos mediante el uso de las inmunoglobulinas y sus fragmentos, como se describe en la patente de EE. UU. núm. 5,045,312, en donde la hormona del crecimiento humana se conjuga a la albúmina de suero bovino o a inmunoglobulina de ratón mediante un agente de reticulación. Los conjugados tienen una actividad mejorada en comparación con la hormona del crecimiento no modificada. Otras diversas proteínas de fusión también se preparan como se expresan en mamíferos después de que el fragmento Fc de inmunoglobulina se une al interferón (publicación de patente coreana núm. 10-2003-0009464), al receptor de la interleucina-4, al receptor de la interleucina-7 o a la eritropoyetina (patente coreana núm. 10-249572). La publicación de patente PCT núm. WO 01/03737 describe una proteína de fusión en la cual una citocina o un factor de crecimiento se une a través de un oligopéptido enlazador a un fragmento Fc de inmunoglobulina. Además, la patente de EE. UU. núm. 5,116,964 describe una proteína la cual se fusiona al extremo amino o carboxi de un fragmento Fc de inmunoglobulina mediante el uso de una técnica de recombinación genética. La patente de EE. UU. núm. 5,349,053 describe una proteína de fusión en la cual la IL-2 está unida a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un enlace peptídico.

Se han descrito muchas otras proteínas de fusión a Fc construidas mediante el uso de técnicas de recombinación genética, ejemplos de las cuales incluyen una proteína de fusión de un fragmento Fc de inmunoglobulina con el interferón-beta o un derivado del mismo (publicación de patente PCT núm. WO 00/23472) y un fragmento Fc de inmunoglobulina con un receptor de IL-5 (patente de EE. UU. núm. 5,712,121). Además, se ha usado un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador más que como elemento de fusión, como se describe en la patente de EE. UU. núm. 7,736,653.

La producción de inmunoglobulinas o de fragmentos Fc de inmunoglobulina se ha llevado a cabo predominantemente en *E. coli*. La empresa estadounidense Amgen Inc. describió, en la patente de EE. UU. núm. 6,660,843 y las publicaciones de patente de EE. UU. núms. 2004-0044188 y 2004-0053845, un derivado de Fc de IgG1 humana que tiene delecciones de aminoácidos en los primeros cinco residuos de aminoácidos de la región bisagra, la cual se fusiona al extremo amino o carboxilo terminal de una proteína terapéutica o de una proteína terapéutica imitada por un péptido, y la producción del mismo mediante el uso de un hospedero *E. coli*. Sin embargo, esta proteína de fusión que no tiene una secuencia señal se expresa como cuerpos de inclusión y, por lo tanto, debe someterse a un proceso de replegamiento adicional. Este proceso de replegamiento de proteínas reduce los rendimientos y, especialmente en una proteína presente como homodímero o heterodímero, reduce notablemente la producción de dímeros. Además, cuando una proteína que no tiene una secuencia señal se expresa en *E. coli*, se añade un residuo de metionina al extremo N-terminal del producto de expresión debido a la característica del sistema de expresión de la proteína de *E. coli*. Los productos de expresión mencionados anteriormente de Amgen Inc. tienen un residuo de metionina N-terminal, el cual puede inducir respuestas inmunitarias tras la administración

repetida o excesiva al cuerpo. Además, dado que estas moléculas de fusión se expresan en forma de una proteína de fusión en *E. coli* mediante la unión de un gen que codifica una proteína terapéutica a un gen Fc, son difíciles de expresar en *E. coli* y una proteína terapéutica es difícil de producir en *E. coli* si su expresión en *E. coli* en una forma fusionada da como resultado una disminución o pérdida significativa de la actividad. Además, dado que la fusión de dos moléculas crea una secuencia de aminoácidos anormal que se produce de forma no natural en la región de conexión entre dos proteínas, la proteína de fusión podría potencialmente ser reconocida como una materia extraña por el sistema inmunológico y, por tanto, inducir respuestas inmunitarias.

Como se describió anteriormente, el uso de *E. coli* es ventajoso porque las proteínas terapéuticamente efectivas se pueden expresar como formas aglicosiladas con un alto rendimiento gracias a la rápida tasa de crecimiento de *E. coli* y la tecnología acumulada de fermentación y bioingeniería, pero tiene la desventaja de que las proteínas recombinantes tienen metionina como primer residuo amino terminal, a diferencia de las proteínas nativas, y requieren un proceso de purificación complejo en cuanto a la eliminación de los pirógenos (endotoxinas) derivados de *E. coli* y el replegamiento de proteínas.

Por otro lado, el uso de células animales permite ventajosamente la producción de proteínas de fusión como proteínas glicosiladas similares a las formas de inmunoglobulina nativa, pero sufre la desventaja de tener un alto costo de producción y ser muy propensas a la contaminación con virus o proteínas de origen animal. Por tanto, existe una demanda creciente de soluciones para los problemas mencionados anteriormente. Se recomienda una estrategia de utilización de levaduras que tenga las ventajas de *E. coli* y de las células animales como células hospederas.

Entre las levaduras usadas para la producción de proteínas es representativa *Saccharomyces cerevisiae*. Además de ser segura para el cuerpo humano, la eucariota *Saccharomyces cerevisiae* es fácil de manipular genéticamente y cultivar a gran escala. Además, se han desarrollado varios sistemas de expresión para el eucariota. Cuando se producen proteínas derivadas de células superiores, tales como las proteínas humanas, mediante el uso de un método recombinante, este microorganismo además proporciona a las proteínas la capacidad de secretarse fuera de las células y modificarse postraduccionalmente, tal como mediante la glicosilación. Además, la proteína recombinante de la levadura experimenta el plegamiento y la formación de enlaces disulfuro, la glicosilación durante la secreción extracelular impulsada por señales de secreción, con lo cual evoluciona a una forma completamente bioactiva. La levadura también es económicamente beneficiosa porque no requiere de la lisis celular y el replegamiento de proteínas, los cuales son de baja eficacia. Sin embargo, lo que se ha mostrado como un problema con el sistema de secreción de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* es la gran variación en la tasa de secreción en dependencia del tipo de proteína humana. A menudo, las proteínas para su uso como medicamentos humanos de alto valor son difíciles de expresar y secretar en *Saccharomyces cerevisiae* (patente de Corea núm. 10-0798894).

El documento WO 2005/047334 A1 se refiere a "un fragmento Fc de IgG útil como portador de fármacos" y "métodos para su preparación".

Peng Cao y otros, (App Microbiol Biotechnol, 2008, 78: 275-282) se refiere a la "generación de una proteína de fusión del dominio extracelular de BR3 con el fragmento Fc de IgG1h en *Pichia pastoris*".

Huijuan Li y otros (Nat Biotechnol, 2006, 24(2):210-5) se refiere a "Optimización de IgG humanizadas en *Pichia pastoris* modificadas por glicoingeniería".

El documento CN1974601A se refiere a una "proteína de fusión a Fc de nuevo tipo y su producción".

El documento WO 2008/145138 A1 se refiere a "semianticuerpos monovalentes modificados con fucosa recombinantes obtenidos por ingeniería molecular".

El documento KR 2005 0047030 A se refiere a un "fragmento Fc de IgG para un portador de fármacos y un método para su preparación".

#### [Descripción]

#### [Problema técnico]

La investigación intensiva y exhaustiva sobre el uso de las levaduras en la producción de proteínas para medicamentos humanos, realizada por los presentes autores, dio como resultado el hallazgo de que la levadura *Pichia* sp., una especie de levadura metilotrófica, se puede usar para producir un fragmento Fc de inmunoglobulina secretor, útil como portador de fármacos, a un alto nivel de expresión sin un proceso de replegamiento adicional, ni la modificación N-terminal con un aminoácido adicional, y que el fragmento Fc de inmunoglobulina secretor puede purificarse mediante el uso de un proceso simple, con la carga mínima de endotoxina o de patógenos extraños de origen animal.

#### [Solución técnica]

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. Este y otros aspectos del documento pueden entenderse más completamente al hacer referencia a la siguiente descripción.

La presente descripción proporciona un transformante preparado mediante la introducción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento Fc de inmunoglobulina humana en una levadura *Pichia* sp..

También se proporciona un método para producir un fragmento Fc de inmunoglobulina, que comprende cultivar el transformante y recuperar el fragmento Fc de inmunoglobulina a partir del cultivo.

También se proporciona un fragmento Fc de inmunoglobulina, producido por el método, para su uso como portador de fármacos.

#### [Efectos ventajosos]

El transformante recombinante de la presente descripción puede superar los problemas asociados al uso de *E. coli* o células animales como células hospederas en la producción de un fragmento Fc de inmunoglobulina, es útil como portador de fármacos y puede encontrar aplicaciones en la producción efectiva y económica de fármacos.

#### [Descripción de las figuras]

La Figura 1 es una vista esquemática que ilustra los procesos de construcción del vector de expresión recombinante pPIC9K-IgG4Fc.

La Figura 2 es una vista esquemática que ilustra los procesos de construcción del vector de expresión recombinante pPIC9K-mPSCFc.

La Figura 3 es una imagen de PCR que muestra la incorporación de los genes de interés al ADN genómico de clones de copias múltiples seleccionados con 3 mg/ml y 4 mg/ml de Geneticina.

#### [Mejor modo]

En la presente descripción se describe un transformante, modificado mediante la introducción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento Fc de inmunoglobulina humana en la levadura *Pichia* sp.

Como se usa en la presente descripción, el término "inmunoglobulina", también conocido como "anticuerpo", se refiere a una proteína que se produce por el sistema inmunológico en respuesta a un estímulo antigénico y que se une específicamente a un antígeno específico durante la vigilancia a través de la sangre y la linfa para ejercer una reacción antígeno-anticuerpo. Las inmunoglobulinas se componen fundamentalmente de dos cadenas ligeras de longitud completas idénticas y dos cadenas pesadas de longitud completa idénticas, con conexiones mediante enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas y entre las cadenas pesadas y las cadenas ligeras. Existen cinco tipos distintos de cadenas pesadas en base a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: gamma ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ), alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ), y las cadenas pesadas incluyen las siguientes subclases: gamma 1 ( $\gamma$ 1), gamma 2 ( $\gamma$ 2), gamma 3 ( $\gamma$ 3), gamma 4 ( $\gamma$ 4), alfa 1 ( $\alpha$ 1) y alfa 2 ( $\alpha$ 2). De acuerdo con las características de las regiones constantes de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se clasifican en cinco isotipos: IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. El isotipo representativo IgG se divide a su vez en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Para el propósito de la presente descripción, el término "inmunoglobulina" incluye un fragmento funcional de una molécula de inmunoglobulina, así como una molécula de inmunoglobulina completa. Este fragmento funcional significa un fragmento que retiene una función de unión al antígeno e incluye Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd y Fc.

Entre los fragmentos de inmunoglobulina, Fab contiene las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada, la región constante de la cadena ligera y la primera región constante (CH1) de la cadena pesada, y tiene un único sitio de unión al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en términos de tener la región bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio C<sub>H</sub>1 de la cadena pesada. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se producen como un par de fragmentos Fab' formado mediante el enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de las regiones bisagra de los fragmentos Fab'. El Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene solo la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Los fragmentos scFv (Fv de cadena única) comprenden la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, las cuales están unidas entre sí mediante un enlazador peptídico y, por tanto, están presentes en una única cadena polipeptídica. Además, los fragmentos Fd comprenden solo la región variable y el dominio C<sub>H</sub>1 de la cadena pesada. Estos fragmentos funcionales de moléculas de inmunoglobulina pueden obtenerse mediante el uso de enzimas proteolíticas (por ejemplo, un anticuerpo completo se digiere hasta convertirse en el Fab mediante la digestión con papaína y hasta convertirse en el F(ab')<sub>2</sub> mediante la digestión con pepsina) o mediante la tecnología de recombinación genética.

Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento Fc de inmunoglobulina" se refiere a un fragmento de inmunoglobulina que está compuesto por dos cadenas pesadas que contribuyen con dos dominios constantes (CH2 y CH3), desprovistos de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas, el dominio constante 1 de la cadena pesada (CH1) y el dominio constante de la cadena ligera (CL1). Opcionalmente, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede comprender además una región bisagra unida al dominio constante de la cadena pesada. Debido a que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un polipéptido biodegradable que puede metabolizarse in vivo, es seguro para su uso como portador de fármacos. Además, un fragmento Fc de inmunoglobulina es ventajoso en comparación con una molécula de inmunoglobulina completa en términos de la preparación, la purificación y el rendimiento de un conjugado debido a su menor peso molecular. Sin el fragmento Fab, el cual es heterogéneo porque difiere en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo a otro, se espera que el fragmento Fc de inmunoglobulina aumente en gran medida la homogeneidad del conjugado mientras disminuye la probabilidad de provocar la antigenicidad sanguínea del conjugado.

El fragmento Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento Fc extendido el cual comprende una parte o la totalidad del dominio constante 1 de la cadena pesada (CH1) y/o el dominio constante 1 de la cadena ligera (CL1) desprovisto de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, siempre que muestre efectos sustancialmente idénticos o superiores a los del fragmento Fc clásico. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede estar compuesto por el CH2 y/o el CH3 que carezca de una parte significativa de la secuencia de aminoácidos. En consecuencia, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede estar compuesto por 1) el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3 y el dominio CH4, 2) el dominio CH1 y el dominio CH2, 3) el dominio CH1 y el dominio CH3, 4) el dominio CH2 y el dominio CH3, 5) una combinación de uno o más dominios constantes y una región bisagra de inmunoglobulina (o una región bisagra parcial), o 6) un dímero de cada dominio constante de la cadena pesada y el dominio constante de la cadena ligera.

Además, se pretende que el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente descripción comprenda no solo las secuencias de aminoácidos nativas sino también sus mutantes. El mutante de la secuencia de aminoácidos significa una secuencia de aminoácidos diferente a la secuencia nativa mediante la delección, la inserción, la sustitución no conservadora o conservadora de uno o más residuos de aminoácidos o sus combinaciones. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331 del Fc de la IgG, los cuales se conoce que desempeñan un papel importante en la unión de los anticuerpos, pueden modificarse para usarse como sitios de unión adecuados. Además, son posibles varios mutantes que, por ejemplo, carezcan de un residuo que forme un enlace disulfuro, o de varios aminoácidos N-terminales del Fc nativo, o que tengan un residuo de metionina adicional en el extremo N-terminal del Fc nativo. Además, las funciones efectoras pueden excluirse mediante la eliminación de un motivo de unión al complemento, por ejemplo, el motivo de unión a C1q o un motivo de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Puede hacerse referencia a las publicaciones PCT núms. 97/34631 y 96/32478 relativas a la preparación de mutantes de secuencia de aminoácidos de fragmentos Fc de inmunoglobulinas. El fragmento Fc puede ser una forma nativa aislada a partir de los humanos y otros animales incluidos las vacas, las cabras, los cerdos, los ratones, los conejos, los hámsteres, las ratas y los cobayas, o pueden ser un recombinante o un derivado del mismo, obtenidos a partir de células animales o microorganismos transformados. En el primer caso, la inmunoglobulina completa se aísla de los humanos o los animales, seguido de un tratamiento enzimático. Cuando se trata con papaína, la inmunoglobulina completa se divide en el Fab y el Fc. La pepsina escinde la inmunoglobulina completa en el pF'c y el F(ab). A partir de estos fragmentos, el Fc o el pF'c pueden separarse mediante el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño. Se prefiere un dominio Fc de inmunoglobulina recombinante derivado del dominio Fc humano en los microorganismos.

Para los propósitos de la presente descripción, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede ser uno derivado de la IgG, tal como un fragmento Fc de la IgG1, un fragmento Fc de la IgG2, un fragmento Fc de la IgG3, un fragmento Fc de la IgG4 y similares, preferentemente un fragmento Fc de la IgG2 o un fragmento Fc de la IgG4, más preferentemente un fragmento Fc de la IgG4, y lo más preferentemente un fragmento Fc de la IgG4 codificado por la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento Fc de la IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11.

El fragmento Fc de inmunoglobulina puede sufrir una sustitución de aminoácidos que no altera la actividad de las proteínas nativas o péptidos en su conjunto. Las sustituciones más típicas ocurren entre Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly. En dependencia de como sea necesario, los aminoácidos pueden modificarse mediante, por ejemplo, la fosforilación, la sulfatación, la acrilación, la glicosilación, la metilación, la farnesilación, la acetilación, la amidación, etc. Estos métodos de modificación se conocen en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979).

Como se usa en la presente descripción, el término "transformación" o "modificación" se refiere a la alteración genética de las células hospederas (incluidas las procariotas, las eucariotas, las células animales y las células vegetales) resultante de la introducción del material genético exógeno, ya sea transportado por un plásmido o no, mediante el uso de una técnica de manipulación genética. El término "transformante" significa una célula que retiene y expresa de manera estable un material genético exógeno introducido desde el exterior, ya sea transportado por un plásmido o no, aunque la célula se divida muchas veces. Cualquier proceso mediante el cual se pueda introducir un

material de ácido nucleico en un organismo, una célula, un tejido, un órgano o un material de ácido nucleico, puede emplearse para llevar a cabo la transformación en la presente descripción. Preferentemente, los métodos estándar conocidos en la técnica pueden seleccionarse en dependencia de las células hospederas. La transformación en levaduras hospederas puede realizarse típicamente mediante el uso de un método descrito por Van Solingen (J. Bact., 1977, 130:946) y Hsiao y otros, (Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.), 1979, 76:3829). Los métodos para transformar las levaduras incluyen, pero no se limitan a, la electroporación mediante el uso de un dispositivo eléctrico y la esferoplastia mediante el uso de un esferoplasto desprovisto de paredes celulares. Para los propósitos de la presente descripción, el transformante puede estar en forma de un clon de múltiples copias resultante de la incorporación de un gen de Fc de inmunoglobulina G al genoma de la levadura hospedera. No se imparten limitaciones particulares al transformante de la descripción siempre que albergue un vector de expresión, el cual comprenda un polinucleótido que codifique un fragmento Fc de inmunoglobulina humana. A modo de ejemplo, pueden usarse *Pichia (Komagataella) pastoris* HMC041 (núm. de acceso KCCM11348P), que tiene el vector de expresión pPIC9K-IgG4Fc que comprende un polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina, o *Pichia (Komagataella) pastoris* HMC042 (núm. de acceso KCCM11350P), la cual tiene el vector de expresión pPIC9K-mPSCFc que comprende un polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente descripción, el término "célula hospedera" significa una célula diana en la cual se introduce un material genético exógeno. Los ejemplos de las células hospederas útiles en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, las levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Neurospora crassa*). Preferentemente, las levaduras se emplean como células hospederas porque pueden expresar la inmunoglobulina recombinante estructuralmente similar a una forma nativa, sin la modificación N-terminal con un aminoácido adicional, ni la necesidad de un proceso de replegamiento, y pueden ser seguras contra la contaminación con una materia de origen animal. Más preferentes son las levaduras *Pichia sp.*, con mayor preferencia por *Pichia pastoris*.

El término "vector de expresión", como se usa en la presente descripción, el cual describe un vector capaz de expresar una proteína diana en una célula hospedera adecuada, se refiere a una construcción genética que comprende elementos reguladores esenciales a los cuales un inserto de gen se une operativamente de tal manera que se exprese en una célula hospedera. No se imparten limitaciones particulares al vector de expresión si porta un polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente descripción. Para los propósitos de la presente descripción, el vector de expresión está configurado para expresar un fragmento Fc de inmunoglobulina después de la transformación en una levadura *Pichia sp.* Por ejemplo, puede ser pPIC9K-IgG4Fc, representado por el mapa de escisión de la Figura 1, o pPIC9K-mPSCFc, representado por el mapa de escisión de la Figura 2.

El término "unido operativamente", como se usa en la presente descripción, se refiere a un enlace funcional entre una secuencia reguladora de la expresión del ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína diana de tal manera que permite las funciones generales. El enlace operativo a un vector recombinante puede prepararse mediante el uso de una técnica recombinante genética bien conocida, y la escisión sitio específica del ADN y la ligación pueden llevarse a cabo mediante el uso de enzimas generalmente conocidas en la técnica.

En algunos casos, se construyen los vectores de expresión pPIC9K-IgG4Fc y pPIC9K-mPSCFc, cada uno de los cuales comprende un polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina. Los vectores de expresión pPIC9K-IgG4Fc y pPIC9K-mPSCFc se transformaron en *Pichia pastoris* para preparar los transformantes, los cuales se denominaron "*Pichia (Komagataella) pastoris* HMC041" y "*Pichia (Komagataella) pastoris* HMC042", y se depositaron en el Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano (ubicado en 361-221, Hongje-1 dong, Seodaemungu, Seúl) el 7 de enero de 2013, con los núms. de acceso KCCM11348P y KCCM11350P, respectivamente.

El término "clon de múltiples copias", como se usa en la presente descripción, se refiere a un transformante en el cual se incorporan aleatoriamente múltiples copias de un gen exógeno al genoma de la célula hospedera mediante la recombinación o el reordenamiento, tras el cruce del gen exógeno con un gen genómico determinado o un sitio de la célula hospedera luego de la introducción del gen exógeno en la célula hospedera mediante la manipulación genética. En general, el clon de copias múltiples puede ser un transformante en el cual una o más copias de un gen seleccionable por un marcador Geneticina se insertan en el genoma de las células hospederas, y preferentemente en el cual cinco o más copias de un gen seleccionable por un marcador Geneticina de 3 mg/ml o más se insertan en el genoma.

También se describe en la presente descripción un método para preparar un fragmento Fc de inmunoglobulina, que comprende cultivar el transformante; y recuperar el fragmento Fc de inmunoglobulina a partir del cultivo. Y el método podría caracterizarse por no requerir un proceso de replegamiento de proteínas adicional.

La levadura *Pichia pastoris* recombinante puede cultivarse en un medio adecuado en condiciones correctas conocidas en la técnica. Los expertos en la técnica pueden ajustar fácilmente el proceso de cultivo en dependencia de la cepa usada.

El fragmento Fc de inmunoglobulina recuperado a partir del cultivo puede usarse sin purificación adicional o se puede purificar mediante el uso de la diálisis, la precipitación salina y la cromatografía. De ellos, la cromatografía es la más usada. No existen reglas que puedan aplicarse universalmente, independientemente del tipo y el orden de las columnas empleadas. De acuerdo con las características de las proteínas diana del anticuerpo y del proceso de cultivo, la selección puede realizarse entre la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de afinidad, la cromatografía hidrofóbica y la columna de afinidad por proteína A.

También se describe en la presente descripción un fragmento Fc de inmunoglobulina, preparado mediante el método, para su uso como portador de fármacos. Al servir como portador, el fragmento Fc de inmunoglobulina forma un conjugado con un fármaco y puede aumentar la biodisponibilidad del fármaco.

Como se usa en la presente descripción, el término "fármaco" indica una sustancia que ejerce un efecto terapéutico en humanos o animales cuando se administra a los mismos. Como ejemplos no limitativos, los péptidos, los polipéptidos, los compuestos, los extractos y los ácidos nucleicos caen dentro del alcance del fármaco, con preferencia por los péptidos o los polipéptidos.

Como se usa en la presente descripción, el término "portador" se refiere a una sustancia que se une a un fármaco, con el objetivo de minimizar una disminución en la actividad fisiológica del fármaco y aumentar la estabilidad in vivo del fármaco. Es decir, la presente descripción proporciona muchos posibles fragmentos Fc de la IgG1, la IgG2, la IgG3 y la IgG4 para aumentar la sostenibilidad in vivo del fármaco y minimizar una disminución de la actividad in vivo del fármaco. Preferentemente, se proporcionan los fragmentos Fc de la IgG2 y Fc de la IgG4. Más preferentemente, la presente descripción proporciona un fragmento Fc de la IgG4. Sin embargo, siempre que tenga un sitio de unión al receptor de FcRn necesario para la sostenibilidad in vivo, cualquier fragmento Fc puede caer dentro del alcance de la presente descripción.

El fragmento Fc de inmunoglobulina preparado mediante el uso del método descrito anteriormente tiene la ventaja de no requerir procesos de plegamiento adicionales y estar libre de residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal. Además, puede expresarse a un nivel mayor, con una carga mínima de endotoxinas o patógenos de origen animal, y puede purificarse mediante el uso de un proceso simple. Dado que es un polipéptido biodegradable que puede metabolizarse in vivo, el fragmento Fc de inmunoglobulina con tales ventajas puede usarse como portador de fármacos. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina es ventajoso sobre una molécula de inmunoglobulina completa en términos de la preparación, la purificación y el rendimiento de un conjugado debido a su menor peso molecular. Sin el fragmento Fab, el cual tiene heterogeneidad porque difiere en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo a otro, se espera que el fragmento Fc de inmunoglobulina aumente en gran medida la homogeneidad del conjugado mientras disminuye la probabilidad de provocar la antigenicidad sanguínea del conjugado.

Entre las subclases de la IgG, la IgG4 es la menos propensa a unirse a un complemento (C1q). Dada la menor afinidad por el complemento, el fragmento Fc es menos apto para mediar funciones efectoras como la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) y, por tanto, para provocar respuestas inmunitarias innecesarias in vivo. La afinidad por C1q es menor en los fragmentos Fc de la IgG2 y la IgG4 que en los fragmentos Fc de la IgG1, y la más baja en los fragmentos Fc de la IgG4. Para su uso como portador de fármacos, el fragmento Fc conjugado a un fármaco tiene que exhibir preferentemente funciones efectoras bajas tales como la ADCC y la CDC. Por tanto, para los propósitos de la presente descripción, los fragmentos Fc de la IgG2 y Fc de la IgG4 son útiles, con mayor preferencia por los fragmentos Fc de la IgG4. Es decir, el fragmento Fc de inmunoglobulina útil como portador de fármacos de acuerdo con la presente descripción, puede ser un fragmento Fc derivado del fragmento Fc de la IgG4 humana o un derivado del mismo que carece de una parte de la bisagra, como se representa en la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 11, las cuales pueden tener la misma secuencia de aminoácidos que la proteína producida por el transformante de *E. coli* HM11201 (KCCM-10660P) descrita en la Patente Coreana No. 10-824505.

#### [Modo]

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente descripción mediante los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión para la producción de fragmentos Fc de inmunoglobulina en *Pichia pastoris***

Se construyó un vector de expresión recombinante para expresar un fragmento Fc de inmunoglobulina humana en la levadura *Pichia pastoris* para anclar una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que codifica un fragmento Fc de inmunoglobulina humana compuesto por una región de bisagra de la IgG4 y los dominios constantes de la IgG4 CH2 y CH3, como sigue.

El ADN del fragmento Fc de inmunoglobulina humana se obtuvo mediante PCR, al utilizar como molde el plásmido pBG4CH1-3 descrito en la patente coreana núm. 10-0725314. Primero, se diseñó un cebador directo (SEQ ID NO: 3) que contenía un sitio de restricción SnaB I para la fusión a una secuencia señal de secreción del factor alfa, mientras

que un cebador inverso (SEQ ID NO: 4) se configuró para tener un sitio de restricción EcoR I. Un ADN que codifica el fragmento Fc de la inmunoglobulina G4 se amplificó mediante PCR mediante el uso de estos cebadores. La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 s, la hibridación a 60 °C durante 30 s y la extensión a 68 °C durante 50 s.

5

5'-GCTTACGTAGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCC-3' (SEQ ID NO: 3)  
5'-CCGGAATTCTCATTTACCCAGAGACAGGGAGAGG-3' (SEQ ID NO: 4)

El ADN del fragmento Fc de la inmunoglobulina G4 (ca. 700 pb) obtenido de esta manera se clonó en un vector pPIC9K (Invitrogen). Para que estuviera en marco con una secuencia señal de secreción del factor alfa, el producto de PCR del fragmento Fc de la inmunoglobulina G4 se digirió con las enzimas de restricción SnaB I y EcoR I, y luego se ligó en presencia de la ligasa T4 a un vector pPIC9K previamente tratado con las mismas enzimas de restricción. El vector de expresión recombinante resultante contenía el gen Fc de la inmunoglobulina G4 inmediatamente corriente abajo de la secuencia señal de secreción del factor alfa, pero el sitio de reconocimiento de SnaB I representado por el cebador directo también se dejó en el vector, de modo que el fragmento Fc de la inmunoglobulina G4, si se expresaba a partir del vector, tendría dos residuos de aminoácidos no deseados en el extremo N-terminal. Para eliminar el sitio de reconocimiento de SnaB I insertado en la unión entre la secuencia señal de secreción del factor alfa y el gen Fc de la inmunoglobulina G4, se llevó a cabo la mutagénesis sitio dirigida mediante el uso de un par de cebadores representados por las SEQ ID NOS: 6 y 7, y el vector de expresión resultante se denominó pPIC9K-IgG4Fc (Figura 1).

10

15

20

5'-GAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA-3' (SEQ ID NO: 6)  
5'-TGGGGGACCATATTTGGACTCAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTC-3' (SEQ ID NO: 7)

25

30

La Figura 1 es una vista esquemática que ilustra los procesos de construcción del vector de expresión recombinante pPIC9K-IgG4Fc, vector que, aunque se describe en la presente descripción, no es un vector de la presente invención. Como puede observarse en la Figura 1, el vector de expresión pPIC9K-IgG4Fc contiene un ADN de SEQ ID NO: 1 bajo el control del promotor del gen de la 5' alcohol oxidasa 1 (AOX1), y puede integrarse al ADN genómico de una célula hospedera a través del gen de la 3' alcohol oxidasa 1 (AOX1) ubicado corriente abajo del gen del Fc de la inmunoglobulina G4.

### **Ejemplo 2: Construcción del vector de expresión para producir un fragmento Fc de inmunoglobulina parcialmente desprovisto de bisagra en *Pichia pastoris***

35

Se construyó un vector de expresión para expresar un fragmento Fc de inmunoglobulina parcialmente desprovisto de la región bisagra en *Pichia pastoris* para anclar una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2), fragmento Fc de inmunoglobulina humana compuesto por una parte de una bisagra de la IgG4 y los dominios constantes CH2 y CH3 de la IgG4, de acuerdo con la misma estrategia que se describe en el Ejemplo 1.

40

Se obtuvo mediante PCR un ADN que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina humana parcialmente desprovisto de una región bisagra, al utilizar como molde el plásmido pBG4CH1-3 descrito en la patente coreana núm. 10-0725314.

45

Primero, se diseñó un cebador directo (SEQ ID NO: 5) que contenía un sitio de restricción SnaB I para la fusión a una secuencia señal de secreción del factor alfa, mientras que un cebador inverso (SEQ ID NO: 4) se configuró para tener un sitio de restricción EcoR I. Un ADN que codifica el fragmento Fc de la inmunoglobulina G4 se amplificó mediante PCR mediante el uso de estos cebadores. La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 s, la hibridación a 60 °C durante 30 s y la extensión a 68 °C durante 50 s.

50

5'-GCTTACGTACCATCATGCCAGCACCTGAGTTCC-3' (SEQ ID NO: 5)

55

60

El ADN del fragmento Fc de la inmunoglobulina G4 (ca. 680 pb) obtenido de esta manera se clonó en un vector pPIC9K (Invitrogen). Para que estuviera en marco con una secuencia señal de secreción del factor alfa, el producto de PCR del fragmento Fc de la inmunoglobulina G4 se digirió con las enzimas de restricción SnaB I y EcoR I, seguido de la ligación en presencia de la ligasa T4 a un vector pPIC9K previamente tratado con las mismas enzimas de restricción. El vector de expresión recombinante resultante contenía el gen Fc de la inmunoglobulina G4 inmediatamente corriente abajo de la secuencia señal de secreción del factor alfa, pero el sitio de reconocimiento de SnaB I representado por el cebador directo también se dejó en el vector, de modo que el fragmento Fc de la inmunoglobulina G4, si se expresaba a partir del vector, tendría dos residuos de aminoácidos no deseados en el extremo N-terminal. Para eliminar el sitio de reconocimiento de SnaB I insertado en la unión entre la secuencia señal de secreción del factor alfa y el gen Fc de la inmunoglobulina G4, se llevó a cabo una mutagénesis sitio dirigida mediante el uso de un par de cebadores representados por las SEQ ID NOS: 8 y 9, y el vector de expresión resultante se denominó pPIC9K-mPSCFc (Figura 2).

65

5'-TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCCATCATGCCAGCACCTGAGTTCTG-3' (SEQ ID NO: 8)  
5'-CAGGAACTCAGGTGCTGGGCATGATGGAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCGAGAGA-3' (SEQ ID NO: 9)

La Figura 2 es una vista esquemática que ilustra los procesos de construcción del vector de expresión recombinante pPIC9K-mPSCFc, el cual forma parte de los transformantes reivindicados definidos en las reivindicaciones. Como puede observarse en la Figura 2, el vector de expresión pPIC9K-mPSCFc contiene un ADN de SEQ ID NO: 2 bajo el control del promotor del gen de la 5' alcohol oxidasa 1 (AOX1), y puede integrarse al ADN genómico de una célula hospedera a través del gen de la 3' alcohol oxidasa 1 (AOX1) ubicado corriente abajo del gen Fc de la inmunoglobulina G4. La célula hospedera transformada con el vector de expresión puede secretar el fragmento Fc de inmunoglobulina parcialmente desprovisto de una región bisagra a un medio de cultivo, impulsado por la secuencia señal de secreción del factor alfa.

### **Ejemplo 3: Transformación en la levadura *Pichia pastoris* y selección de clon de copias múltiples**

Para su uso en la transformación estable y la integración al ADN genómico, los vectores recombinantes pPIC9K-IgG4Fc y pPIC9K-mPSCFc, obtenidos respectivamente en los Ejemplos 1 y 2, se linealizaron mediante la digestión con la enzima de restricción Sall. El vector de expresión del fragmento Fc de IgG recombinante linealizado se diseñó para integrarse en el ADN genómico de un hospedero mediante la recombinación con el sitio del gen de la alcohol oxidasa del hospedero. Se usaron las levaduras *Pichia pastoris* KM71 y GS115 como hospederas a transformar con los vectores de expresión recombinantes obtenidos en los Ejemplos 1 y 2. La transformación se llevó a cabo mediante electroporación, la cual se conoce que es la más popular y eficaz para la levadura. Para su uso en la transformación, se prepararon esferoplastos de *Pichia pastoris* KM71 y GS115 de acuerdo con el protocolo proporcionado por Invitrogen EE. UU..

Después de mezclar bien los 10 ug de cada uno de los vectores recombinantes linealizados con 80 ul del esferoplasto de KM 71 o GS115, la mezcla se incubó durante 5 min en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación en hielo. Luego, se aplicó una descarga eléctrica a la cubeta a 2000 V, 200  $\Omega$ , y 25 uF en un dispositivo de electroporación Gene Pulser (BIO-Rad) para inducir la transformación. Se añadió a la mezcla de reacción 1 ml de sorbitol 1 M enfriado y esta se extendió sobre una placa de agar DM (dextrosa mínima), la cual luego se incubó a 28 °C durante 3 días para seleccionar los transformantes positivos para His+. Para discriminar los clones de copias múltiples, cada uno de los transformantes positivos para His+ formados sobre la placa de agar DM, se suspendió homogéneamente en 1 ml de agua destilada estéril y las suspensiones se extendieron en una cantidad correspondiente a 10<sup>5</sup> células sobre placas de agar YPD que contenían diversas concentraciones de Geneticina (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/ml), seguido de la incubación a 28 °C durante 5 días. De los clones de copias múltiples resistentes a la Geneticina, seleccionados de esta manera, las colonias formadas sobre las placas de agar YPD que contenían 3,0 mg/ml y 4,0 mg/ml se sometieron a PCR de colonias para examinar si los genes de los fragmentos de inmunoglobulina se habían incorporado al ADN genómico. Brevemente, la PCR empleó un par de cebadores de SEQ ID NOS: 3 y 4 para examinar la incorporación del gen del fragmento Fc de inmunoglobulina, y un par de cebadores de SEQ ID NOS: 5 y 4 para examinar la incorporación del gen que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina parcialmente desprovisto de la región bisagra. La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 s, la hibridación a 60 °C durante 30 s y la extensión a 68 °C durante 50 s (Figura 3). La Figura 3 es una imagen de PCR que muestra la incorporación de los genes de interés al ADN genómico de clones de copias múltiples seleccionados con 3 mg/ml y 4 mg/ml de Geneticina. Como puede observarse en la Figura 3, la PCR demostró la incorporación de los genes de fragmento Fc de inmunoglobulina a los genomas de las células hospederas.

Los transformantes preparados mediante la transformación de las cepas de *Pichia pastoris* con los vectores de expresión pPIC9K-IgG4Fc y pPIC9K-mPSCFc, que portaban los genes de fragmento Fc de inmunoglobulina respectivos, se denominaron "*Pichia (Komagataella) pastoris* HMC041" y "*Pichia (Komagataella) pastoris* HMC042", y se depositaron en el Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano (ubicado en 361-221, Hongje-1 dong, Seodaemun-gu, Seúl) el 7 de enero de 2013, con los núms. de acceso KCCM11348P y KCCM11350P, respectivamente.

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Transformante de levadura recombinante y proceso de preparación del fragmento Fc de inmunoglobulina mediante el empleo del mismo

<130> OPA13188/PCT

<160> 11

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 690

<212> ADN

<213> fragmento Fc de IgG

ES 2 865 443 T3

<400> 1

gagtccaaat atggtccccc atgcccatca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 60

5 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 120

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccctg aggtccagtt caactggtac 180

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 240

10 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 300

tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccatcctcca tcgagaaaac catctccaaa 360

15 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 420

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 480

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540

20 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 600

gaggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 660

aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 690

25

<210> 2  
 <211> 666  
 <212> ADN  
 <213> fragmento Fc de IgG

30

<400> 2

ccatcatgcc cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag tcttctgtt cccccaaaa 60

35 cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 120

agccaggaag accctgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat 180

gccaagacaa agccgcgagg ggagcagttc aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 240

40 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 300

ggcctcccat cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 360

45 caggtgtaca ccctgcccc atcccaggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 420

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatggcgag 480

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 540

50 tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaacgtctt ctcatgctcc 600

gtgatgcatg aggtctctga caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctctgggt 660

aatga 666

55

<210> 3  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> cebador

<400> 3

65 gcttacgtag agtccaaata tggccccca tgcc 34

<210> 4

ES 2 865 443 T3

<211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> cebador  
  
 <400> 4  
 ccggaattct cattacca gagacagga gagg 34  
  
 10 <210> 5  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 5  
 20 gcttacgtac catcatgccc agcacctgag ttcc 34  
  
 <210> 6  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 6  
 30 gagaaaagag aggctgaagc tgagtcaaaa tatggtcccc ca 42  
  
 <210> 7  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 7  
 40 tgggggacca tatttgact cagctcagc ctctctttc tc 42  
  
 <210> 8  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 50  
 <400> 8  
 tctctcgaga aaagagaggc tgaagctcca tcatgccag cacctgagtt cctg 54  
  
 <210> 9  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 60  
 <400> 9  
 caggaaactca ggtgctgggc atgatggagc ttcagcctct ctttctcga gaga 54  
  
 <210> 10  
 <211> 229  
 65

ES 2 865 443 T3

<212> PRT  
 <213> fragmento Fc de IgG

<400> 10

5  
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 10 20 25 30  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45  
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 15 50 55 60  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 20 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

<210> 11  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> fragmento Fc de IgG

<400> 11

55

60

65

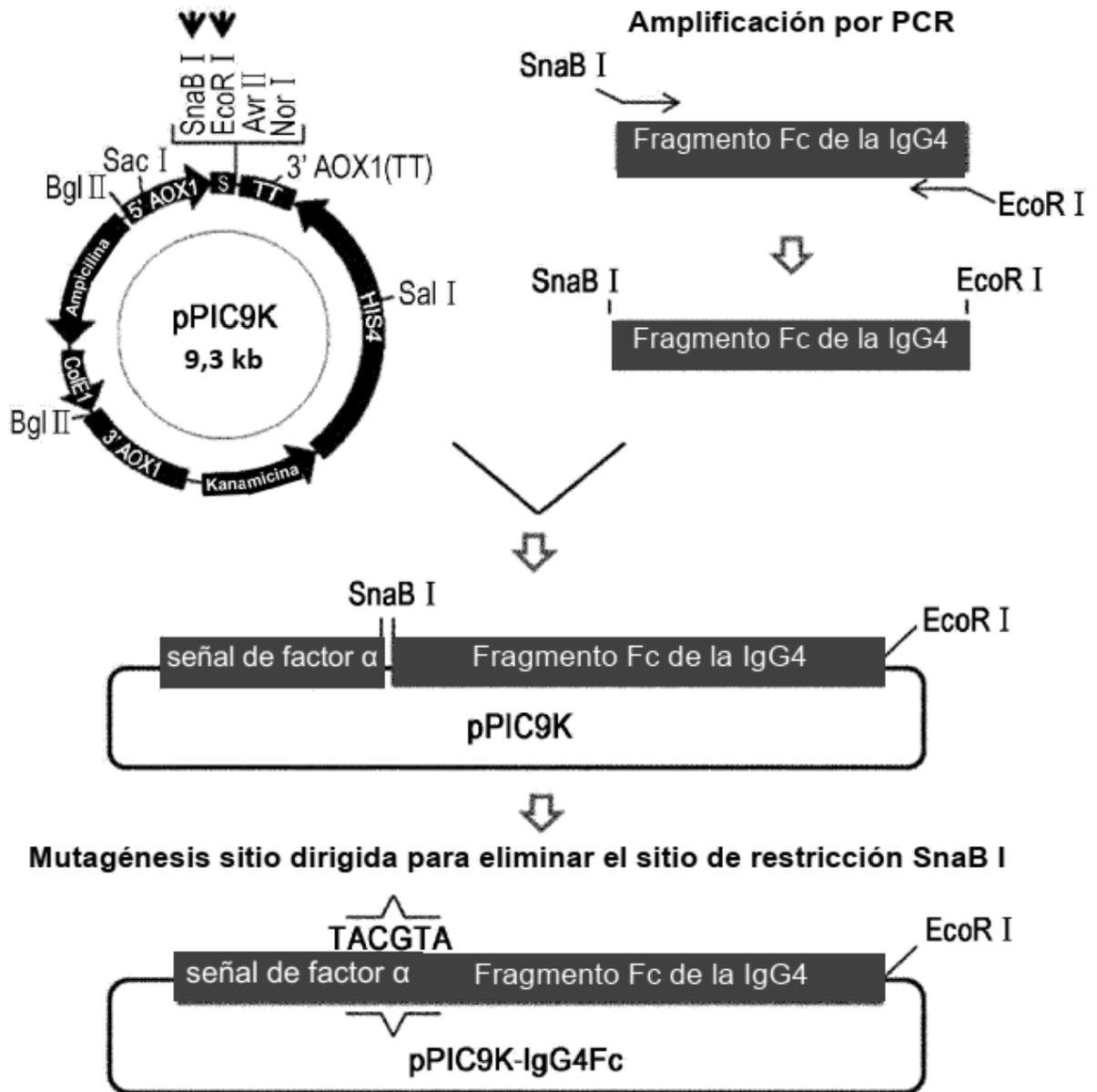
ES 2 865 443 T3

1 Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 5 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 10 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 15 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 20 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 25 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 30 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 35 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 40 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 45 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 50 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 55 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 60 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 65 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 210 215 220

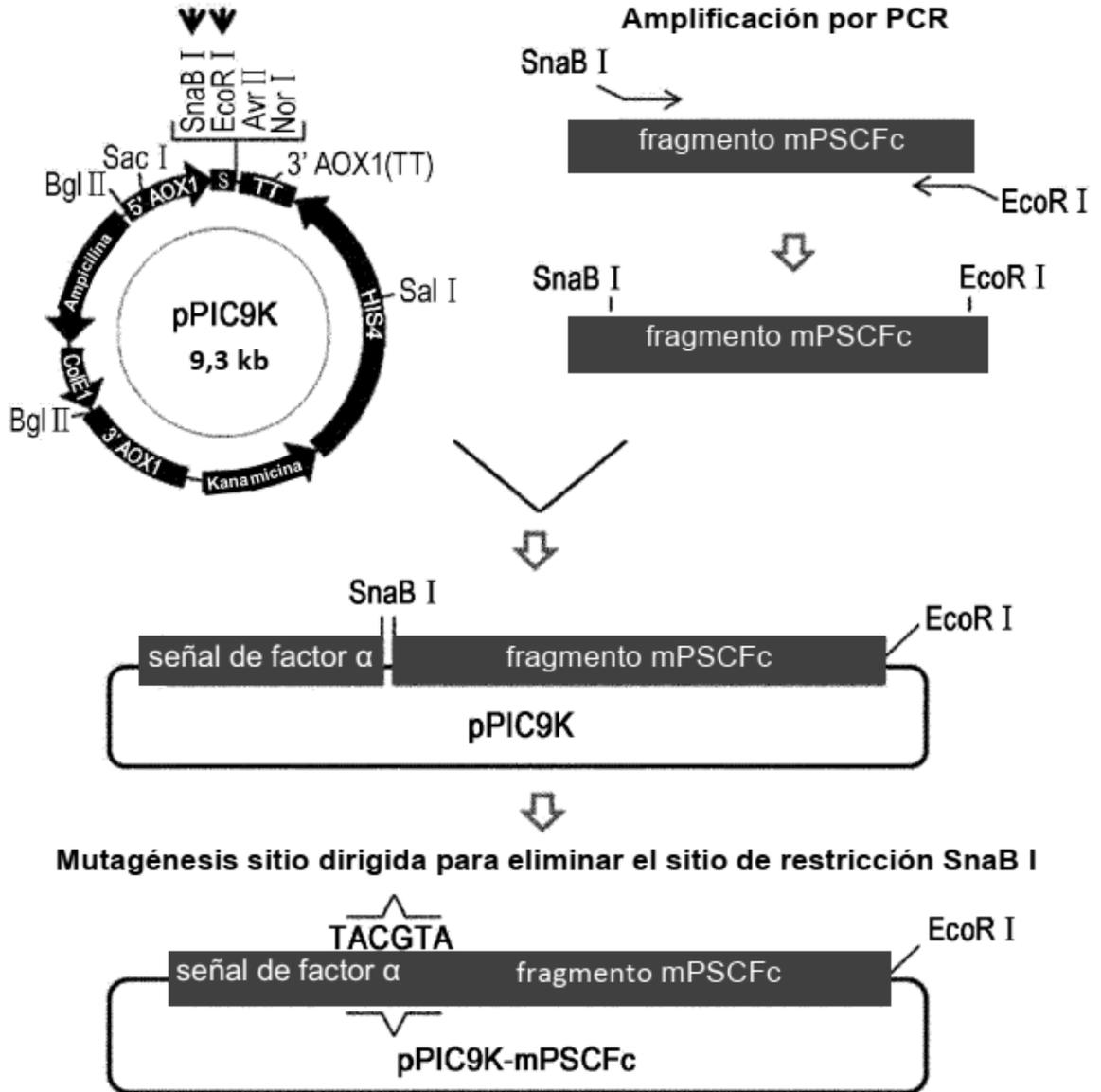
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un transformante, modificado mediante la introducción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un fragmento Fc de inmunoglobulina humana en la levadura *Pichia* sp., en donde el vector de expresión está representado por el mapa de escisión de la Figura 2, y en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11, en donde el vector de expresión contiene el polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina humana inmediatamente corriente abajo de una secuencia señal de secreción del factor alfa, y en donde se elimina el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SnaBI insertado en la unión entre  
10 la secuencia señal de secreción del factor alfa y el polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina.
- 15 2. El transformante de la reivindicación 1, en donde el polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina humana se encuentra bajo el control del promotor del gen de la 5' alcohol oxidasa 1 (5' AOX1), y el vector de expresión contiene un gen de la 3' alcohol oxidasa 1 (3' AOX1) corriente abajo del polinucleótido que codifica el fragmento Fc de inmunoglobulina humana.
- 20 3. El transformante de la reivindicación 1, en donde la levadura *Pichia* sp. es *Pichia pastoris*.
4. El transformante de la reivindicación 1, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2.
- 25 5. El transformante de la reivindicación 1, que es *Pichia (Komagataella) pastoris* HMC042 depositada en el Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano (ubicado en 361-221, Hongje-1 dong, Seodaemungu, Seúl) el 7 de enero de 2013, con el núm. de acceso KCCM11350P.
- 30 6. Un método para producir un fragmento Fc de inmunoglobulina, que comprende:
  - (a) cultivar el transformante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
  - (b) recuperar el fragmento Fc de inmunoglobulina a partir del cultivo.
- 35 7. Uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina como se define en la SEQ ID NO: 11, preparado mediante el método de la reivindicación 6 como portador de fármacos.
8. El método de la reivindicación 6, en donde el método se **caracteriza por** no requerir un proceso de repliegamiento de proteínas adicional.

[Figura 1]



[Figura 2]



[Figura 3]

