



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 362 453**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04735139 .0**
(96) Fecha de presentación : **27.05.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1668030**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

(54) Título: **Un procedimiento para mejorar la eficacia de las proteínas modificadoras de la respuesta biológica y muteínas ilustrativas.**

(30) Prioridad: **26.07.2003 KR 10-2003-0051846**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.07.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.07.2011

(73) Titular/es: **MEDEXGEN Co., Ltd.**
2nd Floor, Medical Bldg a Hanyang University
College of Medicine
17 Haengdang-dong, Seongdong-gu
Seoul 133-791, KR

(72) Inventor/es: **Chung, Yong-Hoon;**
Lee, Hak-Sup;
Yi, Ki-Wan;
Heo, Youn-Hwa y
Kim, Jae-Youn

(74) Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

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

Un procedimiento para mejorar la eficacia de las proteínas modificadoras de la respuesta biológica y muteínas ilustrativas

- 5 La presente invención se refiere a una variante de proteína en la que la fenilalanina se sustituye por valina en un dominio de unión que tiene una función modificadora de la respuesta biológica por unión a un receptor, ligando o sustrato. Más en particular, la presente invención se refiere a una variante de proteína que sustituye el resto de fenilalanina por valina en un dominio de hélice α que participa en la unión de una proteína citoquina humana a un receptor correspondiente.

Técnica anterior

- 15 Muchas enfermedades humanas están causadas por la pérdida de la función de proteínas debido a defectos o una cantidad insuficiente de una proteína. Para tratar dichas enfermedades, se han administrado proteínas relacionadas directamente a los pacientes. Sin embargo, muchas proteínas fisiológicamente activas usadas como medicamentos se degradan fácilmente en el suero antes de que lleguen a los tejidos diana y actúen en los mismos. Por esta razón, la mayoría de las proteínas fisiológicamente activas que tienen valor terapéutico se administran en exceso o frecuentemente a los pacientes para mantener una concentración adecuada capaz de ofrecer efectos terapéuticos

- 20 satisfactorios.
- Un procedimiento para resolver los problemas anteriores es conjugar proteínas fisiológicamente activas con polietilenglicol (PEGilación) o microencapsularlas. Sin embargo, estos procedimientos son difíciles porque las proteínas diana se producen principalmente en microorganismos y se purifican, y después son PEGiladas o microencapsuladas. Además, se puede producir entrecruzamiento en posiciones no deseadas, que pueden afectar negativamente a la homogeneidad de los productos finales.

- 30 Otro procedimiento implica la glicosilación. Las proteínas de superficie celular y proteínas secretoras producidas por células eucariotas son modificadas por un proceso de glicosilación. Se sabe que la glicosilación influye en la estabilidad in vivo y función de proteínas, así como en sus propiedades fisiológicas. Sin embargo, puesto que las proteínas glicosiladas sólo pueden ser producidas por células eucariotas capaces de realizar la glicosilación, su procedimiento de producción es complicado, y es difícil conseguir productos finales homogéneos que sean glicosilados en todas las posiciones deseadas.

- 35 Además, todas las técnicas convencionales mejoran los problemas asociados con la frecuencia de administración, pero no aumentan la eficacia fisiológica de las proteínas, conduciendo a una dosificación excesiva. Por ejemplo, NESP desarrollado por la Amgen Company (véase la patente de EE.UU. nº 6.586.398) mejora la frecuencia de administración prolongando las semividas de las proteínas en la sangre, pero no aumenta la eficacia de las proteínas, conduciendo a una dosificación excesiva que puede inducir la producción de anticuerpos bloqueantes.

- 40 Un procedimiento usado para mejorar la eficacia de las proteínas fisiológicamente activas es mutagenizar algunos restos de aminoácidos de una proteína natural para mejorar la actividad biológica de la proteína. Se describen variantes de proteínas relacionadas en las siguientes publicaciones de patentes: (1) patente de EE.UU. nº 5.457.089: variantes de la eritropoyetina humana (EPO) en las que la región carboxilo terminal se alteró para aumentar la afinidad de unión de la EPO a su receptor, (2) publicación de patente internacional nº 02/077034: variantes del factor estimulador de colonias de granulocitos humano (G-CSF) en las que se alteró un epítipo de linfocito T para reducir la inmunogenicidad del G-CSF humano en seres humanos; (3) publicación de patente internacional nº 99/57147: variantes de trombopoyetina humana (TPO) preparadas sustituyendo el ácido glutamínico en la posición 115 por lisina, arginina o tirosina en una proteína TPO que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos de aminoácidos 7º al 151º de la TPO madura humana; y (4) patentes de EE.UU. nº 6.136.563 y 6.022.711 que describen variantes de la hormona del crecimiento humana que tienen sustituciones de alanina en las posiciones 18, 22, 25, 26, 29, 65, 168 y 174.

- 50 Sin embargo, las variantes de proteínas mencionadas antes son formas alteradas hechas para mejorar sólo la eficacia terapéutica independientemente de cambios en la antigenicidad in vivo. Por lo tanto, la escala, grado y posición de estas alteraciones tienen un alto potencial para inducir respuestas inmunitarias en seres humanos. La antigenicidad en seres humanos puede causar efectos adversos graves (Casadevall y col. *N. Eng. J. Med.* 2002, vol. 346, p. 469).

Descripción de la invención

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar variantes de proteínas modificadoras de la respuesta biológica que tengan mejor acción farmacológica, que sean capaces de maximizar los efectos modificadores de la respuesta biológica tras la administración y prevenir la formación de anticuerpos bloqueantes mediante una mejora en la eficacia de las proteínas modificadoras de la respuesta biológica convencionales, y procedimientos para preparar dichas variantes.

En un aspecto, la presente invención proporciona una variante de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, de una proteína que tiene una función modificadora de la respuesta biológica por unión a un receptor, ligando o sustrato.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ADN de acuerdo con la reivindicación 6.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 7.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 9.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 9 y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11.

Breve descripción de los dibujos

Los objetos, características y otras ventajas anteriores y otros de la presente invención, se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos que acompañan, en los que:

La figura 1A es un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de dominios que participan en la unión de citoquinas de haces de 4 hélices a los correspondientes receptores;

La figura 1B es un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de dominios que participan en la unión de interferones a los correspondientes receptores;

La figura 2A muestra los resultados de la transferencia Western de variantes de TPO de acuerdo con la presente invención (desde la banda más a la izquierda: marcador, TPO natural; TPO-[F46V]; TPO-[F128V]; TPO-[F131V]; y TPO-[F141V]);

La figura 2B muestra los resultados de la transferencia Western de variantes de EPO de acuerdo con la presente invención (desde la banda más a la izquierda: marcador, EPO natural; EPO-[F48V]; EPO-[F138V]; EPO-[F142V]; y EPO-[F148V]);

La figura 2C muestra los resultados de la transferencia Western de variantes de G-CSF de acuerdo con la presente invención (desde la banda más a la izquierda: marcador, G-CSF natural; G-CSF-[F13V]; G-CSF-[F83V]; G-CSF-[F113V]; G-CSF-[F140V]; G-CSF-[F144V]; y G-CSF-[F160V]);

La figura 3A es una gráfica que muestra los niveles de expresión relativos de variantes de TPO de acuerdo con la presente invención, comparados con una TPO natural;

La figura 3B es una gráfica que muestra los niveles de expresión relativos de variantes de EPO de acuerdo con la presente invención, comparados con una EPO natural;

La figura 3C es una gráfica que muestra los niveles de expresión relativos de variantes de G-CSF de acuerdo con la presente invención, comparados con un G-CSF natural;

La figura 4A muestra los resultados de un ensayo ELISA de la afinidad de unión de variantes de TPO de acuerdo con la presente invención a receptores de TPO;

La figura 4B muestra los resultados de un ensayo ELISA de la afinidad de unión de variantes de EPO de acuerdo con la presente invención a receptores de EPO;

La figura 4C muestra los resultados de un ensayo ELISA de la afinidad de unión de variantes de G-CSF de acuerdo con la presente invención a receptores de G-CSF;

10 La figura 4D muestra los resultados de un ensayo ELISA de la afinidad de unión de variantes de GH de acuerdo con la presente invención a receptores de GH;

La figura 5A muestra los resultados de un ensayo de SPR de la afinidad de unión de variantes de TPO de acuerdo con la presente invención a receptores de TPO;

15 La figura 5B muestra los resultados de un ensayo de SPR de la afinidad de unión de variantes de EPO de acuerdo con la presente invención a receptores de EPO;

La figura 6A muestra los resultados de un análisis FACS de la afinidad de unión de una variante de TPO de acuerdo con la presente invención a receptores de TPO;

La figura 6B muestra los resultados de un análisis FACS de la afinidad de unión de una variante de EPO de acuerdo con la presente invención a receptores de EPO;

25 La figura 7A es una gráfica que muestra las velocidades de proliferación de células TF-1/*c-Mpl* de acuerdo con la concentración de variantes de TPO de acuerdo con la presente invención;

La figura 7B es una gráfica que muestra las velocidades de proliferación de células TF-1 de acuerdo con la concentración de variantes de EPO de acuerdo con la presente invención;

30 La figura 7C es una gráfica que muestra las velocidades de proliferación de células HL-60 de acuerdo con la concentración de variantes de G-CSF de acuerdo con la presente invención;

La figura 7D es una gráfica que muestra las velocidades de proliferación de células Nb2 de acuerdo con la concentración de variantes de GH de acuerdo con la presente invención;

La figura 8A es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo farmacocinético de una variante de TPO de acuerdo con la presente invención, en el que la variante de TPO se inyectó por vía intravenosa a conejos y se midieron los niveles en el suero de la variante de TPO;

40 La figura 8B es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo farmacocinético de una variante de EPO de acuerdo con la presente invención, en el que la variante de EPO se inyectó por vía intravenosa en conejos y se midieron los niveles en el suero de la variante de EPO;

45 La figura 8C es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo farmacocinético de una variante de EPO de acuerdo con la presente invención, en el que la variante de EPO se inyectó por vía intraperitoneal en ratones y se midieron los niveles en el suero de la variante de EPO;

50 Las figuras 9A, 9B y 9C son gráficas que muestran las velocidades de proliferación de eritrocitos, velocidades de proliferación de reticulocitos, y cambios de hematocritos, respectivamente, como resultado de los ensayos para evaluar la actividad in vivo de variantes de EPO de acuerdo con la presente invención, en ratones a los que se inyectaron variantes de EPO por vía intraperitoneal; y

Las figuras 10A, 10B y 10C son gráficas que presentan las velocidades de proliferación de plaquetas, leucocitos y neutrófilos respectivamente, como resultado de ensayos para evaluar la actividad in vivo de variantes de TPO de acuerdo con la presente invención, en ratas a las que se inyectaron variantes de TPO por vía intraperitoneal.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Las letras mayúsculas individuales que representan aminoácidos, como se usa en el presente documento, representan los siguientes aminoácidos de acuerdo con las abreviaturas estándar definidas por la Unión Internacional de Bioquímica:

- A: Alanina; B: Asparagina o Ácido aspártico;
 C: Cisteína; D: ácido aspártico; E: Ácido glutámico;
 10 F: Fenilalanina; G: Glicina; H: Histidina;
 I: Isoleucina; K: Lisina; L: Leucina;
 M: Metionina; N: Asparagina; P: Prolina;
 Q: Glutamina; R: Arginina; S: Serina;
 T: Treonina; V: Valina; W: Triptófano;
 15 Y: Tirosina; y Z: Glutamina o Ácido glutámico

La designación "(una letra mayúscula para un aminoácido)(posición de aminoácido)(una letra mayúscula para otro aminoácido)", como se usa en el presente documento, significa que el primer aminoácido se sustituye por el último aminoácido en la posición de aminoácido designada en una determinada proteína. Por ejemplo, F48V indica que el
 20 resto de fenilalanina en la posición 48 de una determinada proteína se sustituye por valina. La posición de aminoácido se numera desde el extremo N de la proteína natural madura.

La expresión "variante de proteína", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la forma natural, por sustitución de un resto de fenilalanina por valina en una
 25 proteína que tiene función fisiológica por unión a un receptor, ligando o sustrato, en particular, en un dominio que participa en la unión a un receptor, ligando o sustrato. En la presente invención, una variante de proteína se designa por conveniencia como "nombre de la proteína-["(una letra mayúscula para un aminoácido)(posición de aminoácido)(una letra mayúscula para otro aminoácido)]". Por ejemplo, TPO-[F131V] indica una variante de TPO en la que el resto de fenilalanina en la posición 131 de la TPO natural se sustituye por valina.

30 La expresión "proteínas modificadoras de la respuesta biológica", como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas implicadas en mantener la homeostasis en el cuerpo induciendo el inicio o la parada de diferentes respuestas biológicas que ocurren en el cuerpo multicelular, y en regular las respuestas para estar orgánicamente conectadas entre sí. Estas proteínas típicamente actúan por unión a receptores, ligandos o sustratos.

35 Las proteínas capaces de ser alteradas de acuerdo con la presente invención incluyen todas las proteínas que tienen función innata para modular las respuestas biológicas por unión a receptores, ligandos o sustratos. Los ejemplos no limitantes de las proteínas incluyen citoquinas, receptores de citoquinas, moléculas de adhesión, receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), enzimas, tirosina quinasas receptoras, receptores de quimioquinas, otras proteínas de superficie celular y ligandos solubles. Los ejemplos no limitantes de citoquinas incluyen CNTF
 40 (factor neutrófilo ciliar), GH (hormona de crecimiento), IL-1, IL-1Ra (antagonista del receptor de interleuquina-1), lactógeno placentario (PL), cardiolifina, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-17, TNF, TGF (factor de crecimiento transformante), IFN (interferón), GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos), G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), EPO (eritropoyetina), TPO (trombopoyetina), M-CSF (factor estimulador de colonias de monocitos), LIF (factor inhibidor de leucemia), OSM (oncostatina-M), SCF (factor de citoblastos), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), IGF (factor de crecimiento insulínico), y LPT (Leptina). Los ejemplos no limitantes de los receptores de citoquinas incluyen receptores de la hormona de crecimiento (GHR), IL-13R, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-
 45 15R, TNFR, TGFR, IFNR (p. ej., IFN- γ R cadena α , IFN- γ R cadena β), interferón- α R, - β R y - γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gpl30, y Fas (Apo 1). Los ejemplos de receptores de quimioquinas incluyen CCR1 y CXCR1. Los ejemplos de tirosina quinasas receptoras incluyen TrkA, TrkB, TrkC, Hrk, REK7, Rse/Tyro-3, R de factor de crecimiento de hepatocitos, R de factor de crecimiento derivado de plaquetas y Flt-1. Los ejemplos de otras proteínas de superficie celular incluyen CD2, CD4, CD5, CD6, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD100, CD137, CD150, LAG-3, B7, B61, β -neurexina, CTLA-4, ICOS, ICAM-1, complemento R-2 (CD21), IgER,
 50 membrana lisosomal gp-1, proteína relacionada con el receptor de microglobulina α -2 y receptor de péptido natriurético.

Para mejorar la eficacia de la modulación de las respuestas biológicas para las numerosas proteínas mencionadas antes que tienen función moduladora de la respuesta biológica, la presente invención pretende proporcionar

variantes de proteínas capaces de unirse a receptores, ligandos o sustratos que tienen una fuerza hidrófoba mayor que las naturales. Para este propósito, la presente invención se caracteriza por la sustitución del resto de fenilalanina por valina en un dominio de unión de cada una de las proteínas.

- 5 La fenilalanina es un aminoácido relativamente no polar que tiene una cadena lateral aromática y un índice de hidrofobicidad conocido de 3,0. La valina es un aminoácido hidrófobo no polar que tiene una cadena lateral alifática y un índice de hidrofobicidad conocido de 4,0. Además, puesto que la valina es más pequeña que la fenilalanina, una proteína que sustituye fenilalanina por valina queda más profundamente hundida en el bolsillo de unión a un receptor, ligando o sustrato correspondiente. Por lo tanto, una proteína que sustituye el resto de fenilalanina por
10 valina en un dominio de unión tiene una mayor fuerza hidrófoba y un espacio más profundamente hundido de modo que tiene una mayor afinidad de unión a un receptor ligando o sustrato, conduciendo a un aumento deseado de la eficacia de la modulación de la respuesta biológica.

- Además, la sustitución de un resto de fenilalanina por valina, como sustitución conservativa, tiene una influencia
15 mínima en la estructura secundaria o terciaria de una proteína y por lo tanto raramente afecta a la función de la proteína (Argos, *EMBO J.* 1989, vol. 8, pág. 779-85). Además, debido a que la fenilalanina está principalmente presente en una región muy hidrófoba, raramente está expuesta al exterior. Cuando dicho resto de fenilalanina se sustituye por valina, la proteína queda más profundamente hundida desde la superficie debido a la mayor hidrofobicidad de la valina. Por lo tanto, esta sustitución tiene un menor potencial para inducir la producción de anticuerpos. Una determinada proteína debe unirse principalmente a un receptor, ligando o sustrato
20 correspondiente, para modular una respuesta biológica específica. En el caso de que esta unión sea más fuerte, mejora la eficacia de la modulación de una respuesta biológica, y todas las proteínas relacionadas se pueden alterar de acuerdo con la presente invención, y la presente invención incluye todas las variantes de proteínas resultantes.

- 25 El hecho de que dicha sustitución de un resto de fenilalanina por valina conduzca a una mayor afinidad de unión está apoyado por el descubrimiento de una mutación de Fc γ R11a (CD16) expresada en células NK en enfermedades autoinmunes humanas. La proteína receptora humana tiene un polimorfismo genético. Es decir, los individuos se dividen en dos grupos: en la posición 176 en una región que participa en el reconocimiento de Fc de un ligando de anticuerpo, un grupo tiene fenilalanina y el otro un tiene valina. Los individuos que tienen fenilalanina en la posición
30 176 del receptor tienen una afinidad de unión debilitada por la región Fc del ligando de anticuerpo y son muy susceptibles al lupus eritematoso sistémico (LES) (Jianming Wu y col., *J. Clin. Invest.* 1997, vol. 100, pp. 1059-70).

- Por otra parte, como se ha indicado antes, la presente invención se caracteriza por la sustitución de un resto de fenilalanina por valina en un dominio de unión de una proteína moduladora de la respuesta biológica. La expresión
35 "dominio de unión", como se usa en el presente documento se refiere a una parte (es decir, dominio) de una proteína que realiza su función biológica uniéndose a un receptor, ligando o sustrato, y tiene una hidrofobicidad relativamente alta y baja antigenicidad comparado con otras regiones de la proteína. Los dominios de unión de proteínas son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, algunas citoquinas e interferones de haces de 4 hélices α , que se usan en una realización de la presente invención, se sabe que tienen una estructura de hélice D- α y una estructura de hélice A- α ,
40 respectivamente, que sirven como dominios de unión para los correspondientes receptores.

- Sin embargo, un dominio de unión alterado de acuerdo con la presente invención no se limita a los dominios de unión conocidos en la técnica. Esto se debe a que en la unión de una proteína moduladora de la respuesta biológica a un receptor, ligando o sustrato, influye, además de los restos de aminoácidos implicados en la unión directa, varios
45 otros restos de aminoácidos. Un "dominio de unión" de una proteína moduladora de la respuesta biológica, alterada de acuerdo con la presente invención, incluye además aproximadamente 50 restos de aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 25 restos de aminoácidos, y más preferiblemente aproximadamente 10 restos de aminoácidos, desde ambos extremos de un dominio de unión conocido en la técnica.

- 50 Un aspecto de la presente invención implica citoquinas que contienen típicamente varias estructuras de hélices α . Entre ellas, la primera y la última hélice del extremo N son conocidas como dominios de unión que participan en la unión de las citoquinas a los correspondientes receptores de citoquinas (véase la figura 1). Las hélices α responsables de la unión de las citoquinas a los correspondientes receptores difieren de acuerdo con el tipo de citoquina, y son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la IL-2, la segunda y quinta hélices se unen al receptor p55 α entre los receptores de IL-2, la primera hélice se une al receptor p75 γ entre los receptores de IL-2, y la sexta
55 hélice se une al receptor gamma (Fernando Bazan, *Science J.* 1992, vol. 257, pág. 410-2). Como se ha descrito antes, cada una de las citoquinas tiene hélices particulares que participan en la unión, pero las hélices tienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas. La presente invención proporciona una variante de citoquina que es capaz de unirse a un receptor de citoquina con mayor afinidad que una citoquina natural, sustituyendo un

resto de fenilalanina por valina en la hélice alfa correspondiente a un dominio de unión de una citoquina.

Un aspecto relacionado con las citoquinas implica la familia de citoquinas de haces de 4 hélices. Dichas citoquinas incluyen CNTF, EPO, Flt3L, GM-CSF, IL-2, IL-3, L-4, IL-5, L-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO G-CSF, GHR e IFN. Estas citoquinas tienen todas 4 hélices alfa, que se denominan hélice alfa-A, hélice alfa-B, hélice alfa-C y hélice alfa-D, respectivamente. Las hélices alfa D y A participan principalmente en la unión a receptores (Fernando Bazar, *Immunology today*, 1990, vol. 11 pág. 350-4, *The Cytokine Facts Book*, 1994, pág. 104-247).

Entre las citoquinas de haces de 4 hélices mencionadas, CNTF, EPO, Flt3L, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, L-12p35, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO, G-CSF y GHR, tienen dominios de unión que incluye cada uno una hélice alfa-D y una región de unión a una hélice alfa-C y la hélice alfa-D. Más en particular, los dominios de unión incluyen restos de aminoácidos entre las posiciones 110 y 180 entre los restos de aminoácidos de las citoquinas de haces de 4 hélices. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una variante de citoquina de haz de 4 hélices que es capaz de unirse a un receptor correspondiente con mayor afinidad que una natural, por sustitución de restos de aminoácidos fenilalanina por valina entre las posiciones 110 y 180 de una citoquina de haz de 4 hélices.

De las citoquinas de haces de 4 hélices mencionadas antes, los interferones (p. ej., IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IFN- τ) tienen un dominio de unión que contiene una "hélice alfa-A". Más en particular, el dominio de unión de interferones incluye restos de aminoácidos entre las posiciones 1 y 50. Por lo tanto, en otro aspecto la presente invención proporciona una variante de interferón que es capaz de unirse a un receptor de interferón que tiene mayor afinidad que uno natural, sustituyendo restos de aminoácidos fenilalanina por valina entre las posiciones 1 y 50 de un interferón.

Por otra parte, el dominio de unión alterado de acuerdo con la presente invención puede incluir dos o más restos de fenilalanina. Los dos o más restos de fenilalanina pueden sustituirse todos por valina. Sin embargo, debido a que este caso conduce a una gran reducción de los niveles de expresión de la proteína, preferiblemente solo se sustituye un resto de fenilalanina por valina. En relación con esto, los autores de la presente invención encontraron que cuando un resto de fenilalanina presente en una región muy hidrófoba se sustituye por valina, la proteína moduladora de la respuesta biológica tiene una eficacia muy mejorada. Por lo tanto, en la presente invención, el resto de fenilalanina que se va a sustituir por valina se selecciona preferiblemente en una región muy hidrófoba presente en el dominio de unión especificado de acuerdo con la presente invención. La hidrofobicidad para una región específica de una secuencia de aminoácidos que comprende una proteína, se puede determinar por un procedimiento conocido en la técnica (Kyte, J. y col., *J. Mol. Biol.* 1982, vol. 157, pág. 105-132, Hopp, T. P. y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78 (6), pág. 3824-3828).

La variante de una proteína moduladora de la respuesta biológica de acuerdo con la presente invención, se puede preparar por procedimientos sintéticos químicos conocidos en general en la técnica (Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman and Co., NY 1983). Los procedimientos representativos, pero sin limitar, incluyen síntesis en fase líquida o sólida, condensación de fragmentos, y síntesis química con F-MOC o T-BOC (*Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Williams y col., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; *A Practical Approach*, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989).

Alternativamente, la variante de proteína de acuerdo con la presente invención se puede preparar por técnicas de ADN recombinante. Estas técnicas incluyen un procedimiento para preparar una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de acuerdo con la presente invención. Dicha secuencia de ADN se puede preparar alterando una secuencia de ADN que codifica una proteína natural. Brevemente, después de sintetizar una secuencia de ADN que codifica una proteína natural, se cambia un codón para fenilalanina por otro codón para valina mediante mutagénesis dirigida, generando así una secuencia de ADN deseada.

La preparación de una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de acuerdo con la presente invención, también se puede lograr mediante un procedimiento químico. Por ejemplo, se puede sintetizar una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína mediante un procedimiento químico usando un sintetizador de oligonucleótidos. Un oligonucleótido se hace basándose en una secuencia de aminoácidos de una variante de proteína deseada, y preferiblemente seleccionando un codón adecuado usado por una célula huésped que produce una variante de proteína. La degeneración en el código genético, lo que significa que un aminoácido es especificado por más de un codón, es bien conocida en la técnica. Por lo tanto, hay una pluralidad de secuencias de ADN con degeneración que codifican una variante de proteína específica, y entran todas dentro del alcance de la presente invención.

Una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de acuerdo con la presente invención puede incluir o no una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal. La secuencia señal, si está presente, debe ser reconocida por una célula huésped seleccionada para la expresión de la variante de proteína. La secuencia señal puede tener un origen procariota o eucariota o un origen combinado, y puede ser una secuencia señal de una proteína nativa. El uso de una secuencia señal se puede determinar de acuerdo con el efecto de la expresión de una variante de proteína como una forma secretora en una célula recombinante que produce la variante de proteína. Si una célula seleccionada es una célula procariota, una secuencia de ADN típicamente no codifica una secuencia señal sino que en su lugar contiene preferiblemente una metionina N-terminal para la expresión directa de una proteína deseada, y lo más preferiblemente, se usa una secuencia señal derivada de una proteína natural.

Dicha secuencia de ADN como se ha preparado antes se une operativamente a otra secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de la presente invención, y se inserta en un vector que incluye una o más secuencias de control de la expresión que regulan la expresión de la secuencia de ADN resultante. Después, un huésped se transforma o transfecta con el vector de expresión recombinante resultante. El transformante o transfectante resultante se cultiva en un medio adecuado en condiciones adecuadas para la expresión de la secuencia de ADN. Se recupera una variante sustancialmente pura de una proteína moduladora de la respuesta biológica codificada por la secuencia de ADN del cultivo resultante.

El término “vector”, como se usa en el presente documento, significa una molécula de ADN que sirve como vehículo capaz de llevar establemente genes exógenos a las células huésped. Para aplicaciones útiles, un vector debe ser replicable, tener un sistema para introducirse él mismo en una célula huésped y tener marcadores seleccionables. Además, la expresión “vector de expresión recombinante”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN circular que lleva genes exógenos operativamente unidos en el mismo para ser expresados en una célula huésped. Cuando se introduce en una célula huésped, el plásmido de expresión recombinante tiene la capacidad de replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped con un número de copias alto y producir ADN heterogéneo. Como se sabe en general en la técnica, con el fin de aumentar el nivel de expresión de un gen transfectado en una célula huésped, el gen debe estar operativamente unido a secuencias funcionales reguladoras de la transcripción y la traducción en una célula huésped seleccionada como sistema de expresión. Preferiblemente, las secuencias reguladoras de la expresión y los genes exógenos pueden llevarse en un solo vector de expresión que contiene marcadores seleccionables bacterianos y un origen de replicación. En el caso de que se usen células eucariotas como sistema de expresión, el vector de expresión debe comprender además marcadores de expresión útiles en las células huésped eucariotas.

La expresión “secuencias de control de la expresión”, como se usa en el presente documento en relación con un vector de expresión recombinante, se refiere a secuencias de nucleótidos necesarias o ventajosas para la expresión de la variante de proteína de acuerdo con la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña para la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de proteína. Los ejemplos no limitantes de las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias líder, secuencias de poliadenilación, secuencias de péptidos, promotores, potenciadores o secuencias activadoras en la dirección 5', secuencias de péptido señal, y terminadores de la transcripción. La secuencia de control de la expresión contiene al menos una secuencia promotora.

La expresión “operativamente unido” se refiere a un estado en el que una secuencia de nucleótidos está dispuesta con otra secuencia de nucleótidos en una relación funcional. Las secuencias de nucleótidos pueden ser un gen y secuencias de control, que están unidas de forma que la expresión del gen es inducida cuando una molécula adecuada (por ejemplo, proteína activadora de la transcripción) se une a la o las secuencias de control. Por ejemplo, cuando una presecuencia o secuencia líder secretora facilita la secreción de una proteína madura, se dice que está “operativamente unida a la proteína”. Un promotor está operativamente unido con una secuencia codificante cuando regula la transcripción de la secuencia codificante. Un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante cuando está presente en una posición que permite la traducción de la secuencia codificante. Típicamente, la expresión “operativamente unida” significa que las secuencias de nucleótidos unidas están en contacto entre sí. En el caso de una secuencia líder secretora, la expresión significa que está en contacto con una secuencia codificante y está presente en un marco de lectura de la secuencia codificante. Sin embargo, un potenciador no tiene que estar necesariamente en contacto con una secuencia codificante. La unión de las secuencias de nucleótidos se puede lograr mediante ligado en sitios de reconocimiento de enzimas de restricción convenientes. En ausencia de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, se pueden usar adaptadores o conectores oligonucleótidos, que se sintetizan por procedimientos convencionales.

Con el fin de expresar una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de acuerdo con la presente

invención, se puede usar una amplia variedad de combinaciones de células huésped y vectores como sistema de expresión. Los vectores de expresión útiles para transformar células huésped eucariotas contienen secuencias de regulación de la expresión, por ejemplo, de SV40, papilomavirus bovino, adenovirus, virus adenosociados, citomegalovirus y retrovirus. Los vectores de expresión útiles en células huésped bacterianas incluyen plásmidos bacterianos de *E. coli*, que se ilustran por pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC, pBR322, pMB9 y derivados de los mismos, plásmidos que tienen una amplia variedad de células huésped, tales como RP4, ADN de fagos ilustrados por una amplia variedad de derivados de fagos λ incluyendo λ gt10, λ gt11 y NM989, y otros fagos ADN, ilustrados por fagos ADN monocatenarios filamentosos, tales como M13. Los vectores de expresión útiles en células de levaduras incluyen el plásmido 2μ y derivados de los mismos. Los vectores de expresión útiles en células de insectos incluyen pVL941.

Para expresar una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de acuerdo con la presente invención, estos vectores pueden usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen las asociadas con genes estructurales de los vectores de expresión mencionados antes. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles incluyen los promotores temprano y tardío de SV40 o adenovirus, el sistema lac, el sistema trp el, el sistema TAC o TRC, promotores T3 y T7, el operador principal y regiones promotoras del fago λ , las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa, por ejemplo, Pho5, los promotores del sistema de apareamiento de levaduras alfa y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diferentes combinaciones de los mismos. En particular, el promotor de la ARN polimerasa T7 Φ 10 es útil para la expresión de un polipéptido en *E. coli*.

Las células huésped transformadas o transfectadas con el vector de expresión recombinante mencionado antes comprenden otro aspecto de la presente invención. Se puede usar una amplia variedad de células huésped mononucleares para expresar una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de la presente invención. Los ejemplos de células huésped incluyen células procariotas y eucariotas tales como *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, hongos o levaduras, células de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* (Sf9), células animales tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células de ratón, células de mono verde africano tales como COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 o BMT 10, y células humanas y vegetales de cultivo tisular. Los huéspedes preferidos incluyen bacterias tales como *E. coli* y *Bacillus subtilis*, y tejidos de mamíferos de cultivo tisular.

La transformación y transfección se pueden realizar por los procedimientos descritos en manuales experimentales (Davis y col., *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986; Sambrook, J., y col., *Basic Methods in Molecular Biology*, 1989). Los procedimientos preferidos para introducir una secuencia de ADN que codifica la variante de proteína de acuerdo con la presente invención en un huésped, incluyen, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística e infección.

También se entenderá que todos los vectores y secuencias de control de la expresión no funcionan igual al expresar la secuencia de ADN de la presente invención. Igualmente, todos los huéspedes no funcionarán igual para un sistema de expresión idéntico. Sin embargo, los expertos en la materia pueden hacer una selección adecuada de diferentes vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes dentro del alcance de la presente invención, sin una sobrecarga experimental. Por ejemplo, se puede seleccionar un vector teniendo en cuenta una célula huésped porque el vector deberá replicarse en la célula huésped. Debe estudiarse el número de copias de un vector, la capacidad para controlar el número de copias y la expresión de otras proteínas codificadas por el vector, por ejemplo, un marcador antibiótico. Una secuencia de control de la expresión también puede seleccionarse teniendo en cuenta varios factores. Por ejemplo, debe estudiarse la fuerza relativa, capacidad de control y compatibilidad de la secuencia con la secuencia de ADN de la presente invención, en particular con respecto a posibles estructuras secundarias. Además, la selección de una célula huésped se puede hacer considerando la compatibilidad con un vector seleccionado, toxicidad de un producto codificado por una secuencia de nucleótidos, naturaleza secretora del producto, capacidad para plegar correctamente un polipéptido, requisitos de fermentación o cultivo, capacidad para asegurar la purificación fácil de un producto codificado por una secuencia de nucleótidos, o similares.

En el procedimiento de preparación de la variante de proteína de acuerdo con la presente invención, las células huésped se cultivan en un medio nutriente adecuado para producir un polipéptido usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar por cultivo en matraz con agitación, fermentación a pequeña escala o a gran escala en fermentadores de laboratorio o industriales, realizada en un medio adecuado y en condiciones que permiten que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio

nutriente adecuado que contiene fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en el comercio en proveedores comerciales y se pueden preparar de acuerdo con composiciones publicadas (por ejemplo, el catálogo de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido es secretado en el medio nutriente, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es secretado, se puede recuperar de lisados celulares.

La variante de proteína moduladora de la respuesta biológica de acuerdo con la presente invención se puede recuperar por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante de proteína se puede recuperar del medio nutriente por procedimientos convencionales que incluyen, pero sin limitar, centrifugación, filtración, extracción, liofilizado, evaporación o precipitación. Además, la variante de proteína se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitar, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofobicidad y exclusión por tamaño), electroforesis, solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una variante de una proteína moduladora de la respuesta biológica y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, la variante de la proteína moduladora de la respuesta biológica preferiblemente está contenida en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El excipiente usado en la composición farmacéutica de la presente invención incluye los excipientes, adyuvantes y vehículos usados habitualmente en el campo farmacéutico, que se llaman en conjunto "excipientes farmacéuticamente aceptables". Los excipientes farmacéuticamente aceptables no limitantes útiles en la composición farmacéutica de la presente invención incluyen agentes de intercambio iónico, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero (p. ej., albúmina de suero humano), agentes de tamponamiento (p. ej., fosfato sódico, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos saturados vegetales), agua, sales o electrolitos (p. ej., sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico y sales de cinc), sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidina, sustratos basados en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliarilato, ceras, copolímeros de bloques de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol, y lanolina.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por cualquiera de las vías habituales, si es capaz de llegar al tejido deseado. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar por vía tópica, oral, parenteral, intraocular, transdérmica, intrarrectal e intraluminal, y se puede formular como disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de liberación sostenida. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intracardial, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular como disolución acuosa para la administración parenteral. Preferiblemente, se puede usar una disolución tampón adecuada, tal como disolución de Hank, disolución de Ringer o disolución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones acuosas para inyección se pueden complementar con sustancias capaces de aumentar la viscosidad de las suspensiones, que se ilustran por la carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y dextrano. Además, las suspensiones de los componentes activos, tales como la suspensión aceitosa para inyección, incluyen disolventes o excipientes lipófilos, que se ilustran por aceites grasos tales como aceite de sésamo, y ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. También se pueden usar como vehículos polímeros de amino policatiónicos no lipídicos. Opcionalmente, las suspensiones pueden contener estabilizantes o fármacos adecuados para aumentar la solubilidad de las variantes de proteínas y obtener concentraciones altas de las variantes de proteínas.

La composición farmacéutica de la presente invención está preferiblemente en forma de una preparación inyectable estéril, tal como suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Dicha suspensión se puede formular de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, usando agentes de dispersión o humectantes adecuados (p. ej. Tween 80) y agentes de suspensión. Las preparaciones inyectables estériles también pueden ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral y no tóxico, tal como una disolución en 1,3-butanodiol. Los vehículos y disolventes aceptables incluyen manitol, agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro sódico isotónica. Además, se pueden usar de forma conveniente aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede usar cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono y diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos, tales como ácido oleico y derivados de glicéridos de los mismos, en la preparación de las preparaciones inyectables, como los aceites naturales farmacéuticamente

aceptables (p. ej., aceite de oliva o aceite de ricino), y en particular, derivados polioxietilados de los mismos.

La composición acuosa mencionada antes se esteriliza principalmente por filtración usando un filtro para eliminar bacterias, mezcla con desinfectantes o en combinación con radiación. La composición esterilizada se puede endurecer, por ejemplo, por ejemplo por liofilización para obtener un producto endurecido, y para uso práctico, el producto endurecido se disuelve en agua esterilizada o una disolución diluida esterilizada.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento en relación con la composición farmacéutica de la presente invención, significa una cantidad con la que un componente activo muestra un efecto mejorado o terapéutico frente a una enfermedad para la que se aplica la composición farmacéutica de la presente invención. La cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar de acuerdo con la edad y sexo del paciente, sitios de aplicación, frecuencia de administración, duración de la administración, tipos de formulación y tipos de adyuvantes. Típicamente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en cantidades menores que una proteína natural, por ejemplo, 0,01-1000 µg/kg/día, más preferiblemente 0,1-500 µg/kg/día, y lo más preferiblemente 1-100 µg/kg/día.

Por otra parte, será evidente para los expertos en la técnica que las enfermedades a las que se aplica la presente composición pueden variar de acuerdo con el tipo de proteína. La EPO y TPO alteradas, como en una realización de la presente invención, se pueden usar para tratar además de la propia anemia, la anemia como una complicación asociada con otras enfermedades (p. ej., anemia en la enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad renal progresiva, anemia en la insuficiencia renal, anemia asociada con la infección por VIH en pacientes tratados con zidovudina (AZT), anemia asociada con la quimioterapia para el cáncer, enfermedad de Huntington (HD), anemia de células falciformes, anemia hiporregenerativa tardía por enfermedad hemolítica en recién nacidos inducida por Rh después de transfusión del intercambio en el útero). Además, el G-CSF alterado de acuerdo con la presente invención, se puede usar para tratar la propia neutropenia y la neutropenia desarrollada después de trasplante de la médula ósea o quimioterapia del cáncer, las variantes de GH se pueden usar para tratar el enanismo hipofisario y la insuficiencia renal crónica pediátrica. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas aplicaciones.

En lo sucesivo, la presente invención proporciona variantes de interferones para cada uno de los restos de fenilalanina específicos sustituidos por valina de citoquinas de haces de 4 hélices con detalle, CNTF, EPO, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, GH, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, L-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO, IFN-α2A, IFN-α2B, IFN-β, IFN-γ, IFN-θ e IFN-τ.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona las siguientes variantes de proteínas: (1) una variante de CNTF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 119, 152 o 178 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de un CNTF natural; (2) una variante de EPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 138, 142 o 148 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una EPO natural; (3) una variante de Flt3L que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de un Flt3L natural; (4) una variante de G-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113, 140, 144 o 160 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un G-CSF natural; (5) una variante de GM-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113 o 119 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un GM-CSF natural; (6) una variante de GH que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 139, 146, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una GH natural; (7) una variante de IFN-α2A que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de un IFN-α2A natural; (8) una variante de IFN-α2B que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un IFN-α2B natural; (9) una variante de IFN-β que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un IFN-β natural; (10) una variante de IFN-γ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 32 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de un IFN-γ natural; (11) una variante de IFN-θ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de un IFN-θ natural; (12) una variante de IFN-τ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 39 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de un IFN-τ natural; (13) una variante de IL-2 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 42 o 44 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de una IL-2 natural; (14) una variante de IL-3 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 107 o 113 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de una IL-3 natural; (15) una variante de IL-4 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 112 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de una IL-4 natural; (16) una variante de IL-5 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 69 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una IL-5 natural; (17) una variante de IL-6 que

- sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) de una IL-6 natural; (18) una variante de IL-12p35 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 180 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de una IL-12p35 natural; (19) una variante de LPT que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 92 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) de una LPT natural; (20) una variante de LIF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 156 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de un LIF natural; (21) una variante de M-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 311 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) de un M-CSF natural; (22) una variante de OSM que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 160 o 169 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de una OSM natural; (23) una variante de PL que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de un PL natural; (24) una variante de SCF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 199, 205 o 207 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de un SCF natural; y (25) una variante de TPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 131 o 141 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de una TPO natural.
- 15 En otro aspecto específico, la presente invención proporciona las siguientes moléculas de ADN: (1) un ADN que codifica una variante de CNTF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 119,152 o 178 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de un CNTF natural; (2) un ADN que codifica una variante de EPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 138, 142 o 148 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una EPO natural; (3) un ADN que codifica una variante de Flt3L que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de un Flt3L natural; (4) un ADN que codifica una variante de G-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113,140, 144 o 160 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un G-CSF natural; (5) un ADN que codifica una variante de GM-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 103, 106, 113 o 119 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un GM-CSF natural; (6) un ADN que codifica una variante de GH que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 139, 146, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una GH natural; (7) un ADN que codifica una variante de IFN- α 2A que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de un IFN- α 2A natural; (8) un ADN que codifica una variante de IFN- α 2B que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un IFN- α 2B natural; (9) un ADN que codifica una variante de IFN- β que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un IFN- β natural; (10) un ADN que codifica una variante de IFN- γ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 32 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de un IFN- γ natural; (11) un ADN que codifica una variante de IFN- ω que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de un IFN- ω natural; (12) un ADN que codifica una variante de IFN- τ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 39 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de un IFN- τ natural; (13) un ADN que codifica una variante de IL-2 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 42 o 44 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de una IL-2 natural; (14) un ADN que codifica una variante de IL-3 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 107 o 113 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de una IL-3 natural; (15) un ADN que codifica una variante de IL-4 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 112 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de una IL-4 natural; (16) un ADN que codifica una variante de IL-5 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 69 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una IL-5 natural; (17) un ADN que codifica una variante de IL-6 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) de una IL-6 natural; (18) un ADN que codifica una variante de IL-12p35 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 180 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de una IL-12p35 natural; (19) un ADN que codifica una variante de LPT que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 92 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) de una LPT natural; (20) un ADN que codifica una variante de LIF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 156 o 180 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de un LIF natural; (21) un ADN que codifica una variante de M-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 311 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) de un M-CSF natural; (22) un ADN que codifica una variante de OSM que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 160 o 169 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de una OSM natural; (23) un ADN que codifica una variante de PL que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de un PL natural; (24) un ADN que codifica una variante de SCF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 199, 205 o 207 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de un SCF natural; y (25) un ADN que codifica una variante de TPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 131, 141 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de una TPO natural.

En un aspecto específico adicional, la presente invención proporciona los siguientes vectores de expresión recombinantes: (1) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de CNTF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 119, 152 o 178 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de un CNTF natural; (2) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de EPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 138, 142 o 148 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una EPO natural; (3) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de Flt3L que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de un Flt3L natural; (4) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de G-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113, 140, 144 o 160 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un G-CSF natural; (5) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de GM-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113 o 119 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un GM-CSF natural; (6) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de GH que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 139, 146, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una GH natural; (7) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- α 2A que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de un IFN- α 2A natural; (8) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- α 2B que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un IFN- α 2B natural; (9) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- β que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un IFN- β natural; (10) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- γ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 32 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de un IFN- γ natural; (11) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- ω que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 o 153 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de un IFN- ω natural; (12) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- τ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 39 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de un IFN- τ natural; (13) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-2 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 42 o 44 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de una IL-2 natural; (14) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-3 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 107 o 113 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de una IL-3 natural; (15) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-4 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 112 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de una IL-4 natural; (16) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-5 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 69 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una IL-5 natural; (17) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-6 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) de una IL-6 natural; (18) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-12p35 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 180 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de una IL-12p35 natural; (19) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de LPT que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 92 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) de una LPT natural; (20) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de LIF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 156 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de un LIF natural; (21) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de M-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 311 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) de un M-CSF natural; (22) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de OSM que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 160 o 169 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de una OSM natural; (23) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de PL que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de un PL natural; (24) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de SCF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 199, 205 o 207 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de un SCF natural; y (25) un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de TPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en

la posición 131 o 141 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de una TPO natural.

En otro aspecto específico más, la presente invención proporciona las siguientes células huésped: (1) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de CNTF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 119, 152 o 178 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de un CNTF natural; (2) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de EPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 138, 142 o 148 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una EPO natural; (3) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de Flt3L que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de un Flt3L natural; (4) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de G-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113, 140, 144 o 160 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un G-CSF natural; (5) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de GM-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113 o 119 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un GM-CSF natural; (6) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de GH que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 139, 146, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una GH natural; (7) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- α 2A que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de un IFN- α 2A natural; (8) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- α 2B que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un IFN- α 2B natural; (9) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- β que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un IFN- β natural; (10) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- γ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 32 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de un IFN- γ natural; (11) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- ω que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de un IFN- ω natural; (12) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- τ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 39 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de un IFN- τ natural; (13) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-2 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 42 o 44 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de una IL-2 natural; (14) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-3 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 107 o 113 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de una IL-3 natural; (15) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-4 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 112 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de una IL-4 natural; (16) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-5 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 69 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una IL-5 natural; (17) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-6 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) de una IL-6 natural; (18) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-12p35 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 180 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de una IL-12p35 natural; (19) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de LPT que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 92 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) de una LPT natural; (20) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de LIF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 156 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de un LIF

natural; (21) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de M-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 311 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) de un M-CSF natural; (22) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un
5 ADN que codifica una variante de OSM que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 160 o 169 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de una OSM natural; (23) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de PL que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de un PL natural; (24) una célula huésped transformada o transfectada con un vector
10 de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de SCF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 199, 205 o 207 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de un SCF natural; y (25) una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de TPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 131 o 141 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de una TPO
15 natural.

En otro aspecto específico más, la presente invención proporciona los siguientes procedimientos para preparar una variante de proteína: (1) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un
20 ADN que codifica una variante de CNTF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 119, 152 o 178 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de un CNTF natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (2) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de EPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 138, 142 o 148
25 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una EPO natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (3) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de Flt3L que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de un Flt3L natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (4) un
30 procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de G-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113, 140, 144 o 160 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un G-CSF natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (5) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped
35 transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de GM-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113 o 119 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un GM-CSF natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (6) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que
40 codifica una variante de GH que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 139, 146, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una GH natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (7) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- α 2A que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una
45 secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de un IFN- α 2A natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (8) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- α 2B que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un IFN- α 2B natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo
50 resultante; (9) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- β que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un IFN- β natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (10) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o
55 transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- γ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 32 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de un IFN- γ natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (11) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con

un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- ω que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de un IFN- ω natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (12) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un

5 vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IFN- τ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 39 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de un IFN- τ natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (13) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-2 que sustituye el

10 resto de fenilalanina por valina en la posición 42 o 44 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de una IL-2 natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (14) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-3 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 107 o 113 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de una IL-3

15 natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (15) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-4 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 112 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de una IL-4 natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (16) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-5 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 69 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una IL-5 natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (17) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-6 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) de una IL-6 natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (18) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de IL-12p35 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición

30 180 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de una IL-12p35 natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (19) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de LPT que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 92 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) de una LPT natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (20) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de LIF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 156 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de un LIF natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (21) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula

40 huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de M-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 311 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) de un M-CSF natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (22) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de OSM que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 160 o 169 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de una OSM natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; (23) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de PL que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 10, 31, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de un PL natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo

50 resultante; (24) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de SCF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 199, 205 o 207 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de un SCF natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante; y (25) un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido un ADN que codifica una variante de TPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 131 o 141 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de una TPO natural, y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante.

En otro aspecto específico más, la presente invención proporciona las siguientes composiciones farmacéuticas: (1) una composición farmacéutica que comprende una variante de CNTF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 119, 152 o 178 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de un CNTF natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (2) una composición farmacéutica que comprende una variante de EPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 138, 142 o 148 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una EPO natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (3) una composición farmacéutica que comprende una variante de Flt3L que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de un Flt3L natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (4) una composición farmacéutica que comprende una variante de G-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113, 140, 144 o 160 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un G-CSF natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (5) una composición farmacéutica que comprende una variante de GM-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 113 o 119 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de un GM-CSF natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (6) una composición farmacéutica que comprende una variante de GH que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 139, 146, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una GH natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (7) una composición farmacéutica que comprende una variante de IFN- α 2A que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de un IFN- α 2A natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (8) una composición farmacéutica que comprende una variante de IFN- α 2B que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un IFN- α 2B natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (9) una composición farmacéutica que comprende una variante de IFN- β que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un IFN- β natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (10) una composición farmacéutica que comprende una variante de IFN- γ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 32 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de un IFN- γ natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (11) una composición farmacéutica que comprende una variante de IFN- ω que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de un IFN- ω natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (12) una composición farmacéutica que comprende una variante de IFN- τ que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 39 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de un IFN- τ natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (13) una composición farmacéutica que comprende una variante de IL-2 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 42 o 44 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de una IL-2 natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (14) una composición farmacéutica que comprende una variante de IL-3 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 107 o 113 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de una IL-3 natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (15) una composición farmacéutica que comprende una variante de IL-4 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 112 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de una IL-4 natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (16) una composición farmacéutica que comprende una variante de IL-5 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 69 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una IL-5 natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (17) una composición farmacéutica que comprende una variante de IL-6 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 124 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) de una IL-6 natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (18) una composición farmacéutica que comprende una variante de IL-12p35 que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 180 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de una IL-12p35 natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (19) una composición farmacéutica que comprende una variante de LPT que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 92 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) de una LPT natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (20) una composición farmacéutica que comprende una variante de LIF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 156 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de un LIF natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (21) una composición farmacéutica que comprende una variante de M-CSF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 311 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) de un M-CSF natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (22) una composición farmacéutica que comprende una variante de OSM que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 160 o 169 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de una OSM natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (23) una composición farmacéutica que comprende una variante de PL que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) of de un PL natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; (24) una composición farmacéutica que comprende una variante de SCF que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 199, 205 o 207 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de un SCF natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable; y (25) una

composición farmacéutica que comprende una variante de TPO que sustituye el resto de fenilalanina por valina en la posición 131 o 141 de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de una TPO natural y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 El presente propósito de mejorar la eficacia en la modulación de respuestas biológicas se logró en los siguientes ejemplos usando TPO, EPO, G-CSF y GH. Será evidente para los expertos en la materia que los siguientes ejemplos se proporcionan solo para ilustrar la presente invención y el alcance de la presente invención no está limitado a los ejemplos.

10 **Ejemplo 1.** Construcción de ADN que codifica TPO/EPO/G-CSF/GH naturales

A. Construcción de ADN que codifica la TPO natural

- Se añadieron 750 μ l de reactivo TRIzol (MRC, EE.UU.) a tejido de la médula ósea en un tubo de microcentrífuga y
15 se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron 200 μ l de cloroformo al tubo y después el tubo se agitó enérgicamente durante 15 segundos. Después de incubar el tubo a temperatura ambiente durante 2-3 minutos, se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase superior se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se añadieron 500 μ l de isopropanol. La muestra se incubó a -70°C durante 30 minutos y se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de descartar el líquido sobrenadante, el sedimento de ARN se lavó una vez con
20 DEPC-etanol al 75% mediante mezcla vorticial y se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se separó el líquido sobrenadante y el sedimento de ARN se secó durante 5 minutos a temperatura ambiente y después el sedimento se disolvió en 50 μ l de agua destilada tratada 3 veces con DEPC.

- Se mezclaron 2 μ g de ARNm purificados como antes y 1 μ l de cebador oligo-dT30 (10 μ M, Promega, EE.UU.) y se
25 calentaron a 70°C durante 2 minutos y después se enfriaron inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Después de esto, la mezcla de reacción se añadió a transcriptasa inversa M-MLV 200 U (Promega, EE.UU.), 10 μ l de 5x tampón de reacción (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM), 1 μ l de dNTP (dATP 10 mM, dTTP 10 mM, dGTP 10 mM, dCTP 10 mM) y se añadió agua tratada 3 veces con DEPC para completar el volumen de 50 μ l. Después de mezclar suavemente, la mezcla de reacción se incubó a 42°C durante 60 minutos.

- 30 Para amplificar el ADNc que codifica la TPO natural, se añadieron la primera cadena de ADNc como molde, cebador 1 y cebador 2 (tabla 1) a un tubo de PCR que incluía 2 U de *pfu* ADN polimerasa (Stratagene, EE.UU.), 10 μ l de 10x tampón de reacción, Tritón X-100 al 1%, BSA 1 mg/ml, 3 μ l de cebador 1 (10 μ M), 3 μ l de cebador 2 (10 μ M), 2 μ l de dNTP (dATP 10 mM, dTTP 10 mM, dGTP 10 mM, dCTP 10 mM) y se añadió agua destilada para completar el
35 volumen de 100 μ l. Las condiciones de reacción de la PCR eran como sigue: 1 ciclo a 95°C durante 3 min, y después 30 ciclos a 95°C durante 30 s, a 52°C durante 1 min y a 72°C durante 1,5 min, y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 10 min para hacer el producto de la PCR con extremo completamente romo.

- El producto de la PCR obtenido se separó en gel de agarosa al 0,8% (BMA, EE.UU.) y se purificó con el kit de
40 extracción en gel Qiaex II (Qiagen, EE.UU.). Después de mezclar el ADN aislado con 15 U de *Eco*RI, 10 U de *Not*I, 3 μ l de 10x tampón de reacción y añadir agua destilada para completar el volumen total de 30 μ l, el ADN se trató con las enzimas de restricción por incubación a 37°C durante 2 horas. El producto de la PCR se separó en gel de agarosa al 0,8% y se purificó con el kit de extracción en gel Qiaex II.

- 45 Después se mezclaron 5 μ g de vector pBluescript KS II (+) con 15 U de *Eco*RI, 10 U de *Not*I, 3 μ l de 10x tampón de reacción y se añadió agua destilada para completar el volumen total de 30 μ l, y el ADN se trató con las enzimas de restricción por incubación a 37°C durante 2 horas. El vector pBluescript KS II (+) tratado con las enzimas de restricción se separó en gel de agarosa al 0,8% y se purificó con el kit de extracción en gel Qiaex II.

- 50 Se ligaron 100 ng del vector pBluescript KS II (+) digerido con 20 ng del producto de la PCR que se digirió con las mismas enzimas. Esta mezcla de ligación se incubó en un baño de agua a 16°C durante 16 horas, produciendo así un vector recombinante que comprendía ADNc que codifica la TPO natural. Después se transformó en una *E. coli* Top10 (Invitrogen, EE.UU.) que se convirtió en una célula competente por el procedimiento del cloruro de rubidio. Las bacterias transformadas se cultivaron en placa de agar LB que contenía ampicilina 50 μ g/ml (Sigma, EE.UU.).
55 Después de incubación durante la noche, las colonias se transfirieron a tubos con 3 ml de medio LB que contenía ampicilina 50 μ g/ml y después se cultivaron a 37°C durante 16 horas. El plásmido se aisló de las bacterias cultivadas con el procedimiento de lisis alcalina y se usó el procedimiento con las enzimas de restricción *Eco*RI/*Not*I para detectar la inclusión del gen clonado en el plásmido.

B. Construcción del ADN que codifica la EPO natural

El procedimiento de clonación del ADN que codifica la EPO natural era básicamente el mismo que el usado para la clonación del ADN que codifica la TPO natural.

Se usaron la primera cadena del ADNc como molde, el cebador 11 y cebador 12 (tabla 2) para la amplificación por PCR del ADN que codifica la TPO natural. El producto de la PCR y el vector de clonación, pBluescript KS II (+) se digirieron con las endonucleasas *EcoRI* y *BamHI*. El producto de la PCR digerido y el vector de clonación se ligaron y transformaron en células competentes, *E. coli* Top10 (Invitrogen, EE.UU.). Se aisló el plásmido de las bacterias cultivadas con el procedimiento de lisis alcalina y se usó el procedimiento con las enzimas de restricción *EcoRI/BamHI* para detectar la existencia del gen clonado en el plásmido.

C. Construcción del ADN que codifica el G-CSF natural

El procedimiento de clonación del ADN que codifica el G-CSF natural era similar al usado para el ADN que codifica la TPO natural.

Se usaron leucocitos de gente sana para la extracción del ARNm, y se usaron los cebadores 21 y 22 (tabla 3) para la amplificación por PCR del ADNc que codifica el G-CSF natural. Tanto el producto de la PCR como el vector de clonación, pBluescript KS II (+) se digirieron con las endonucleasas *SmaI* y *EcoRI*. El producto de la PCR digerido y el vector de clonación se ligaron y transformaron en células competentes, *E. coli* Top10 (Invitrogen, EE.UU.). Se aisló el plásmido de las bacterias cultivadas con el procedimiento de lisis alcalina y se usó el procedimiento con las enzimas de restricción *SmaI/EcoRI* para detectar la existencia del gen clonado en el plásmido.

D. Construcción del ADN que codifica la GH natural

El ADN que codifica la GH natural se adquirió en ATCC (ATCC nº 67097). Para añadir la secuencia líder al extremo N-terminal de este ADNc, se usaron el cebador 35 y 36 (tabla 4) para la PCR. Con el fin de completar la unión del ADNc que codifica la GH natural a la secuencia líder, se llevó a cabo una PCR secundaria usando los cebadores 37 y 38 (tabla 4). El producto de la PCR y el vector de clonación, pBluescript KS II (+) se digirieron con las endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*. Se aisló el plásmido de las bacterias cultivadas con el procedimiento de lisis alcalina y se usó el procedimiento con las enzimas de restricción *EcoRI/HindIII* para detectar la existencia del gen clonado en el plásmido.

Ejemplo 2. Construcción del ADNc que codifica las muteínas de TPO/EPO/G-CSF/GH

A. Construcción de los ADNc que codifican las muteínas de TPO

Se construyeron 4 muteínas de TPO, TPO-[F46V], TPO-[F128V], TPO-[F131V] y TPO-[F141V] de acuerdo con los siguientes procedimientos, para tener una sola sustitución de aminoácido de fenilalanina por valina en cada una de las posiciones, respectivamente.

Tabla 1

Cebadores usados en la construcción de los ADNc que codifican la TPO natural y las muteínas.

Nº de cebador		Secuencia de nucleótidos		Secuencia nº
1	TPO natural	Sentido directo	5'-CGGAATTCGATGGAGCTGACTGAATTG-3'	26
2		Sentido contrario	5'-TTTAGCGGCCGCTTACCCTTCCTGAG-3'	27
3	TPO-[F46V]	Sentido directo	T3	
4		Sentido contrario	5'-CCAAGCTAACGTCACAGCAG-3'	28
5	TPO-[F128V]	Sentido directo	T3	
6		Sentido contrario	5'-GCTCAGGACGATGGCAT-3'	29
7	TPO-[F131V]	Sentido directo	T3	
8		Sentido contrario	5'-GGTGTGGACGCTCAGGAAGATG-3'	30
9	TPO-[F141V]	Sentido directo	T3	
10		Sentido contrario	5'-CATCAGGACACGCACCTTTC-3'	31

El ADNc que codifica TPO-[F46V], TPO-[F128V], TPO-[F131V] y TPO-[F141V] se construyó por una PCR primaria usando cebadores específicos (tabla 1) y el cebador universal T3 y una PCR secundaria usando el producto de la PCR primaria y el cebador universal T7. El molde para estas reacciones era el ADNc que codifica la TPO natural clonada en pBluescript KS II (+) obtenido del ejemplo 1.

5

La PCR primaria se llevó a cabo añadiendo 2,5 U de Ex Taq (Takara, Japón), 5 µl de 10x tampón, MgCl₂ 1 mM, dNTP 2,5 mM y se añadió agua destilada para completar el volumen total de 50 µl. Las condiciones de la PCR consistían en 1 ciclo a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos a 95°C durante 30 s, a 60°C durante 30 s y a 72°C durante 30 s, y después se conectó a 1 ciclo a 72°C durante 7 min. El producto de la PCR primaria se usó como un megacebador en la PCR secundaria junto con el cebador universal T7 (10 pmol). Se usó el ADNc que codifica la TPO natural clonada en pBluescript KS II (+) como molde en la PCR secundaria. La PCR secundaria se llevó a cabo añadiendo 2,5 U de Ex Taq, 5 µl de 10x tampón, dNTP 2,5 mM y se añadió agua destilada para completar el volumen total de 50 µl. Las condiciones de la PCR consistían en 1 ciclo a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 min, a 58°C durante 1 min y a 72°C durante 1,5 min, y finalmente se conectó a 1 ciclo a 72°C durante 7 min antes de la terminación.

Para minimizar los errores derivados de la síntesis del ADN, la concentración de Mg²⁺ se redujo a 1 mM en la PCR primaria. Los tamaños de los megacebadores amplificados eran 280 pb para TPO-[F46V], 520 pb para TPO-[F128V], 530 pb para TPO-[F131V] y 560 pb para TPO-[F141V]. En la PCR secundaria que usa megacebadores, los ADNc que codifican cada una de las muteínas producidas presentaron el mismo tamaño de 1062 pb. La sustitución de fenilalanina por valina en la secuencia de nucleótidos de las muteínas de TPO individuales se verificó por secuenciación directa.

Se separó cada uno de los productos de la PCR de 1062 pb en gel de agarosa al 0,8% y se purificaron con el kit de extracción en gel Qiaex II. El producto de la PCR se digirió con 15 U de *EcoRI* y 10 U de *NotI* a 37°C durante 2 horas. El producto de la PCR digerido se separó en gel de agarosa al 0,8% y se purificó con el kit de extracción en gel Qiaex II y se ligó con pBluescript KS II (+) como se ha descrito antes. El vector de expresión recombinante que contiene el ADN que codifica TPO-[F141V] se denominó Teffiacin-4 y se depositó en el KCCM (Centro coreano de cultivo de microorganismos) conforme al Tratado de Budapest del 9 de junio, 2003. El número de acceso dado por la autoridad internacional de depósito era KCCM-10500.

B. Construcción de los ADNc que codifican las muteínas de EPO

Se construyeron 4 muteínas de EPO, EPO-[F48V], EPO-[F138V], EPO-[F142V] y EPO-[F148V] de acuerdo con los siguientes procedimientos, para tener una sola sustitución de aminoácido de fenilalanina por valina en cada una de las posiciones, respectivamente.

Tabla 2
Cebadores usados en la construcción de los ADNc que codifican la EPO natural y las muteínas.

Nº de cebador			Secuencia de nucleótidos	Secuencia nº
11	EPO natural	Sentido directo	5'-GGCGCGGAGATGGGGT-3'	32
12		Sentido contrario	5'-TGGTCATCTGTCCCTGTCTG-3'	33
13	EPO-[F48V]	Sentido directo	T3	
14		Sentido contrario	5'-GACATTAACTTTGGTGTCTGGGAC-3'	34
15	EPO-[F138V]	Sentido directo	5'-CTGTCCGCAAACCTCTCCGAG-3'	35
16		Sentido contrario	T7	
17	EPO-[F142V]	Sentido directo	5'-CGCAAACCTCGTCCGAGTCTACT-3'	36
18		Sentido contrario	T7	
19	EPO-[F148V]	Sentido directo	5'-GAGTCTACTCCAATGTGGTGGG-3'	37
20		Sentido contrario	T7	

40

El procedimiento de construcción de los ADNc que codifican las muteínas de EPO era básicamente similar al de las TPO. Los ADNc que codifican EPO-[F48V], EPO-[F138V], EPO-[F142V] y EPO-[F148V] se construyeron por una PCR primaria usando cebadores específicos (tabla 2) y el cebador universal T3 y una PCR secundaria usando el producto de la PCR primaria y el cebador universal T7. El molde para estas reacciones era el ADNc que codifica la EPO natural clonada en pBluescript KS II (+) obtenido del ejemplo 1.

45

La concentración de Mg^{2+} se ajustó a 1 mM en la PCR primaria. Los tamaños de los megacebadores amplificados eran 300 pb para EPO-[F48V], 550 pb para EPO-[F138V], 550 pb para EPO-[F142V] y 550 pb para EPO-[F148V]. En la PCR secundaria que usa megacebadores, los ADNc que codifican las muteínas individuales se amplificaron al mismo tamaño de 580 pb. La sustitución de fenilalanina por valina en la secuencia de nucleótidos de las muteínas de EPO individuales se verificó por secuenciación directa.

Se separó cada uno de los productos de la PCR de 580 pb en gel de agarosa al 0,8% y se purificaron con el kit de extracción en gel Qiaex II. El producto de la PCR se digirió con 15 U de *EcoRI* y 10 U de *BamHI* a 37°C durante 2 horas. El producto de la PCR digerido se ligó con pBluescript KS II (+) como se ha descrito antes y se usó para construir el vector de expresión. El vector de expresión recombinante que contiene el ADN que codifica TPO-[F141V] se denominó Reffiacin-4 y se depositó en el KCCM (Centro coreano de cultivo de microorganismos) conforme al Tratado de Budapest del 9 de junio, 2003. El número de acceso dado por la autoridad internacional de depósito era KCCM-10501.

C. Construcción de los ADNc que codifican las muteínas del G-CSF

Se construyeron las muteínas de G-CSF, G-CSF-[F13V], G-CSF-[F83V], G-CSF-[F113V], G-CSF-[F140V], G-CSF-[F144V] y G-CSF-[F160V] de acuerdo con los siguientes procedimientos, para tener una sola sustitución de aminoácido de fenilalanina por valina en cada una de las posiciones, respectivamente.

Tabla 3
Cebadores usados en la construcción de los ADNc que codifican el G-CSF natural y las muteínas.

Nº de cebador		Secuencia de nucleótidos		Secuencia nº
21	G-CSF natural	Sentido directo	5'-CCCCGGGACCATGGCTGGACCTGOCACCCAG-3'	38
22		Sentido contrario	5'-CGAATTCGCTCAGGGCTGGGCAAGGAG-3'	39
23	G-CSF-[F13V]	Sentido directo	T7	
24		Sentido contrario	5'-ACTTGAGCAGGACGCTCT-3'	40
25	G-CSF-[F83V]	Sentido directo	5'-AGCGGCCTTGTCCTCTA-3'	41
26		Sentido contrario	T3	
27	G-CSF-[F113V]	Sentido directo	5'-GACGTTGCCACCAACCAT-3'	42
28		Sentido contrario	T3	
29	G-CSF-[F140V]	Sentido directo	5'-GCCGTCGCCTCTGCTTT-3'	43
30		Sentido contrario	T3	
31	G-CSF-[F144V]	Sentido directo	5'-TCGCCTTCTGCTGTCCAG-3'	44
32		Sentido contrario	T3	
33	G-CSF-[F160V]	Sentido directo	5'-TCTGCAAGACGTCCTGG-3'	45
34		Sentido contrario	T3	

El procedimiento de construcción de los ADNc que codifican las muteínas de G-CSF era básicamente similar al de las TPO. Los ADNc que codifican G-CSF-[F13V], G-CSF-[F83V], G-CSF-[F113V], G-CSF-[F140V], G-CSF-[F144V] y G-CSF-[F160V] se construyeron por una PCR primaria usando cebadores específicos (tabla 3) y el cebador universal T3 y una PCR secundaria usando el producto de la PCR primaria y el cebador universal T7. El molde para estas reacciones era el ADNc que codifica el G-CSF natural clonado en pBluescript KS II (+) obtenido del ejemplo 1.

La concentración de Mg^{2+} se ajustó a 1 mM en la PCR primaria. Los tamaños de los megacebadores amplificados eran 600 pb para G-CSF-[F13V], 390 pb para G-CSF-[F83V], 300 pb para G-CSF-[F113V], 200 pb para G-CSF-[F140V], 200 pb para G-CSF-[F144V] y 150 pb para G-CSF-[F160V]. En la PCR secundaria que usa megacebadores, los ADNc que codifican cada una de las muteínas se amplificaron al mismo tamaño de 640 pb. La sustitución de fenilalanina por valina en la secuencia de nucleótidos de las muteínas de G-CSF individuales se verificó por secuenciación directa.

Se separó cada uno de los productos de la PCR de 640 pb en gel de agarosa al 0,8% y se purificaron con el kit de extracción en gel Qiaex II. El producto de la PCR se digirió con 15 U de *SmaI* y 10 U de *EcoRI* a 37°C durante 2 horas y se separó en gel de agarosa al 0,8% y se purificó con el kit de extracción en gel Qiaex II. El producto de la PCR digerido se ligó con pBluescript KS II (+) como se ha descrito antes. El vector de expresión recombinante que contiene el ADN que codifica G-CSF-[F140V] se denominó Greffiacin-4 y se depositó en el KCCM (Centro coreano

de cultivo de microorganismos) conforme al Tratado de Budapest del 17 de mayo, 2004. El número de acceso dado por la autoridad internacional de depósito era KCCM-10571.

D. Construcción de los ADNc que codifican las muteínas de GH

5

Se construyeron las muteínas de GH, GH-[F44V], GH-[F97V], GH-[F139V], GH-[F146V], GH-[F166V] y GH-[F176V] de acuerdo con los siguientes procedimientos, para tener una sola sustitución de aminoácido de fenilalanina por valina en cada una de las posiciones, respectivamente.

10

Tabla 4

Cebadores usados en la construcción de los ADNc que codifican la GH natural y las muteínas.

Nº de cebador		Secuencia de nucleótidos		Secuencia nº
35	Adición de secuencia líder	Sentido directo 1	5'-CTTTTGGCCTGCTCTGCCTGTCTGGCTTCAA GAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTATC-3'	46
36		Sentido contrario	T3	
37		Sentido directo 2	5'-GGAATTCATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCC CTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCT-3'	47
38		Sentido contrario	T3	
39	GH-[F44V]	Sentido directo	T7	
40		Sentido contrario	5'-GGGGTTCTGCAGGACTGAATACTTC-3'	48
41	GH-[F97V]	Sentido directo	T7	
42		Sentido contrario	5'-GGCTGTTGGCGACGATCCTG-3'	49
43	GH-[F139V]	Sentido directo	T7	
44		Sentido contrario	5'-GTAGGTCTGCTTGACGATCTGCCAG-3'	50
45	GH-[F146V]	Sentido directo	T7	
46		Sentido contrario	5'-GAGTTTGTGTGCGACCTTGCTGTAG-3'	51
47	GH-[F166V]	Sentido directo	T7	
48		Sentido contrario	5'-GTCCTTCTGACGCAGTAGAGCAG-3'	52
49	GH-[F176V]	Sentido directo	T7	
50		Sentido contrario	5'-CGATGCGCAGGACTGTCTCGACCTTGTC-3'	53

El procedimiento de construcción de los ADNc que codifican las muteínas de GH era básicamente similar al de las TPO. Los ADNc que codifican las muteínas GH-[F44V], GH-[F97V], GH-[F139V], GH-[F146V], GH-[F166V] y GH-[F176V] se construyeron por una PCR primaria usando cebadores específicos (tabla 4) y el cebador universal T3 y una PCR secundaria usando el producto de la PCR primaria y el cebador universal T7. El molde para estas reacciones era el ADNc que codifica la GH natural clonada en pBluescript KS II (+) obtenido del ejemplo 1.

15

La concentración de Mg^{2+} se ajustó a 1 mM en la PCR primaria. El tamaño de cada uno de los megacebadores amplificados era 130 pb para GH-[F44V], 300 pb para GH-[F97V], 420 pb para GH-[F139V], 450 pb para GH-[F146V], 500 pb para GH-[F166V] y 530 pb para GH-[F176V]. La sustitución de fenilalanina por valina en la secuencia de nucleótidos de las muteínas de GH individuales se verificó por secuenciación directa.

20

Se separó cada uno de los productos de la PCR de 650 pb en gel de agarosa al 0,8% y se purificaron con el kit de extracción en gel Qiaex II. El producto de la PCR se digirió con 15 U de *EcoRI* y 10 U de *HindIII* a 37°C durante 2 horas y se separó en gel de agarosa al 0,8% y se purificó con el kit de extracción en gel Qiaex II. El producto de la PCR digerido se ligó con pBluescript KS II (+) como se ha descrito antes.

25

Ejemplo 3. Expresión y purificación de las muteínas de TPO

30

A. Muteínas de TPO

a. Establecimiento de líneas celulares transfectadas usando el procedimiento de lipofección

35

Se prepararon células de ovario de hámster chino ("CHO-K1") (ATCC, CCL61) con una densidad de $1,5 \times 10^5$ células por placa de 35 mm que contenía medio Eagle modificado por Dulbecco ("DMEM") [Gibco BRL, EE.UU.] complementado con suero bovino fetal ("FBS") al 10%. Las células se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5%, durante 18-24 h. En un tubo estéril se añadieron 6 µl de lipofectamina a 1,5 µg del vector de expresión recombinante que comprendía el ADN que codifica una muteína de TPO. El volumen de esta mezcla se ajustó a 100 µl añadiendo

DMEM exento de suero. El tubo se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Las células cultivadas en la placa de 35 mm se lavaron dos veces con DMEM exento de suero y se añadieron a la placa 800 µl de DMEM exento de suero. Las células lavadas se aplicaron suavemente como una capa sobre el complejo de lipofectamina-ADN y después se incubaron durante 5 h a 37°C en CO₂ al 5%. Después de 5 h de incubación, se añadió 1 ml de DMEM que contenía FBS al 20% a las células transfectadas y después las células se incubaron durante 18-24 h a 37°C, CO₂ al 5%. Después de incubación, las células se lavaron dos veces con DMEM exento de suero y después se añadieron al cultivo 2 ml de DMEM que contenía FBS al 10%. Estas células se incubaron durante 72 h a 37°C, CO₂ al 5%.

10 b. Análisis del nivel de expresión de las muteínas de TPO usando ELISA

Se analizó en las células transfectadas con plásmido que contenía ADNc que codifica la TPO natural o muteínas el nivel de expresión de proteína usando el ensayo ELISA. Se añadió un anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra TPO humana (R&D, EE.UU.) diluido a 10 µg/ml con tampón de recubrimiento [bicarbonato sódico 0,1 M, (pH 9,6)] a cada uno de los pocillos de la placa de 96 pocillos (Falcon, EE.UU.) hasta 100 µl por pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó con Tween-20 al 0,1% en 1X PBS (PBST) 3 veces. Después de lavar, la placa se incubó con 200 µl de tampón de bloqueo (FBS al 1%, sacarosa al 5%, azida sódica al 0,05%) durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavó 3 veces con PBST. Se mezclaron los líquidos sobrenadantes cultivados (que incluían las células transfectadas) y tampón de dilución [BSA al 0,1%, Tween-20 al 0,05%, PBS IX] con diluciones seriadas. Se diluyó de la misma forma TPO humana recombinante 25 ng/ml [Calbiochem, EE.UU.] como control positivo y los líquidos sobrenadantes de CHO-K1 cultivadas no transfectadas como control negativo. Después, la placa se lavó con PBST 3 veces. Se añadió un anticuerpo de cabra dirigido contra TPO humana biotinilado (R&D, EE.UU.) diluido a 0,2 µg/ml con tampón de dilución, a la placa de 96 pocillos hasta 100 µl por pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó con PBST 3 veces. Se añadieron 100 µl por pocillo de estreptavidina-HRP (R&D, EE.UU.) diluida a 1:200 en tampón de dilución, a la placa de 96 pocillos y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 1 h, las placas se lavaron 3 veces con PBST, y después se llevó a cabo la reacción de coloración usando el sistema de sustrato de peroxidasa TMB en micropocillo (KPL, EE.UU.) y se leyó la D.O. a 630 nm con un lector de microplaca [BIO-RAD, modelo 550].

30 c. Análisis del nivel de expresión y peso molecular de muteínas de TPO usando transferencia Western

Con el fin de excluir el FBS en el medio, se usó CHO-S-SFM II (Gibco BRL, EE.UU.) para el cultivo de las células transfectadas anteriores. El medio de cultivo de CHO-S-SFM II se filtró con un filtro de jeringa de 0,2 µm y se concentró con un Centricon (Mol. 30.000 Millipore, EE.UU.). Para llevar a cabo la SDS reducido-PAGE, se añadió tampón de carga de muestra que contenía β-mecaptoetanol al 5% a la muestra y se calentó durante 5 min. Se usaron gel concentrador y gel separador para esta SDS-PAGE. El gel concentrador estaba compuesto de acrilamida al 3,5%, Tris 0,375 M (pH 6,8), SDS al 0,4% y el gel separador estaba compuesto de gel de acrilamida al 10%, Tris 1,5 M (pH 8,8), SDS al 0,4%. Después del tratamiento con el gel separador en la SDS-PAGE, las muestras de proteína se transfirieron a una membrana Westran (transmembrana de PVDF, S&S) que tenía poros de 4 µm, a 350 mA durante 2 h en un depósito que contenía tampón de Tris 25 mM-glicina 192 mM (pH 8,3)-metanol al 20%. Después de la transferencia, se bloqueó 3 veces durante 10 minutos con leche en polvo desnatada al 5% en PBST. El anticuerpo de cabra dirigido contra TPO humana biotinilado (R&D, EE.UU.) se diluyó a 0,25 µg/ml en tampón de bloqueo y se añadieron 3 ml de esta disolución y se agitó durante 6 h. La membrana se lavó con disolución de lavado 3 veces. Se diluyó la estreptavidina-HRP (R&D, EE.UU.) a 1:100 en tampón de bloqueo y se incubó durante 1 h. La membrana se lavó 3 veces con disolución de lavado. Las bandas de proteína se visualizaron por incubación con sustrato DAB (VECTOR LABORATORIES, EE.UU.) durante 10 min. Esta reacción se paró sumergiendo la membrana en agua desionizada.

En la figura 2a, las formas natural y muteínas de la TPO tienen el mismo peso molecular (55 kD).

El nivel de expresión relativo de la TPO natural y las muteínas se muestra en la figura 3a. El nivel de expresión de cada muteína de TPO se comparó con el de la TPO natural como control. El nivel de expresión de TPO-[F128V] era 1,4 veces mayor que el de la TPO natural. Pero la expresión de TPO-[F46V], -[F131V] y -[F141V] disminuyó 20%, 40% y 40% respecto a la natural, respectivamente.

B. Muteínas de EPO

Se transfectaron vectores de expresión que contenían los ADNc que codifican muteínas de EPO en células CHO-K1

y se detectó el nivel de expresión de cada una de las muteínas de EPO usando el ensayo ELISA. Y el peso molecular de la EPO natural y de cada muteína se analizó por transferencia Western.

En la figura 2b, las formas natural y muteínas de la EPO tienen el mismo peso molecular (45 kD).

5

El nivel de expresión relativo de la EPO natural y de las muteínas se muestra en la figura 3b. El nivel de expresión de EPO-[F48V] y EPO-[F138V] era 1,4 y 1,2 veces mayor que el de la EPO natural, respectivamente. Pero el nivel de expresión de EPO-[F142V] y -[F148V] disminuyó 20% y 30% del de la EPO natural, respectivamente.

10 C. Muteínas de G-CSF

Se transfectaron vectores de expresión que contenían los ADNc que codifican las muteínas de G-CSF en células CHO-K1 y se detectó el nivel de expresión de cada una de las muteínas de G-CSF usando el ensayo ELISA. Y el peso molecular del G-CSF natural y de cada muteína se analizó por transferencia Western.

15

En la figura 2c, las formas natural y muteínas del G-CSF tienen el mismo peso molecular (50 kD).

El nivel de expresión relativo de las formas de G-CSF natural y muteínas se muestra en la figura 3c. El nivel de expresión del resto de las muteínas de G-CSF era similar al del G-CSF natural. El nivel de expresión de la muteína de G-CSF [F83V] era 1,9 veces mayor que el del natural. Pero los niveles de expresión de las muteínas de G-CSF [F140V] y [F144V] disminuyeron a 50% y 70% del G-CSF natural respectivamente.

20

D. Muteínas de GH

Se transfectaron vectores de expresión que contenían los ADNc que codifican las muteínas de GH en células CHO-K1. El procedimiento para la expresión de cada una de las muteínas de GH era el mismo que el usado para la producción de TPO.

30 **Ejemplo 4.** Construcción de ADN que codifica receptores de EPO, TPO, G-CSF y GH

30

A. Construcción de ADN que codifica receptores de EPO y TPO

Se construyeron los ADN que codifican receptores de EPO y TPO para analizar las afinidades de unión de cada una de las muteínas de EPO y las muteínas de TPO. Se ligó el ADN que codifica el dominio extracelular de cada receptor al ADN que codifica el dominio Fc de la IgG1, de modo que la región C-terminal del dominio extracelular de cada receptor estaba fusionada con la región N-terminal del dominio Fc de la IgG1 humana. El ADNc que codifica el receptor de EPO se construyó por la PCR usando el cebador de sentido directo (cebador 51) con sitios de restricción de *EcoRI* y la secuencia líder del receptor de EPO y el cebador de sentido contrario (secuencia 52) con la secuencia que codifica el extremo 3' del receptor de EPO y la secuencia que codifica el extremo 5' del dominio Fc de la IgG. El ADNc que codifica el receptor de TPO ligado al dominio Fc de la IgG1 se construyó por la PCR usando el cebador de sentido directo (cebador 53) con sitios de restricción de *HindIII* y la secuencia líder del receptor de TPO y el cebador de sentido contrario (cebador 54) con la secuencia que codifica el extremo 3' del receptor de TPO y la secuencia que codifica el extremo 5' del dominio Fc de la IgG.

35

40

El ADNc que codifica el receptor de EPO producido como se ha descrito antes y el ADN que codifica el dominio Fc de la IgG1, se mezclaron en el mismo tubo, y se indujo la unión complementaria entre las secuencias comunes. Usando esta mezcla, se construyó el ADNc que codifica el receptor de EPO ligado al dominio Fc de la IgG1 por PCR usando el cebador de sentido directo (cebador 51) con sitios de restricción *EcoRI* y la secuencia líder del receptor de EPO y el cebador de sentido contrario (cebador 55) con sitios de restricción *XbaI* y extremo 3' del dominio Fc de la IgG. El producto de la PCR se cortó con *EcoRI* y *XbaI* y se insertó en el vector de expresión PCR-3 para la producción de la proteína de fusión de receptor de EPO-Fc.

50

El ADNc que codifica el receptor de TPO producido como se ha descrito antes y el ADN que codifica el dominio Fc de la IgG se mezclaron en el mismo tubo, por lo tanto se indujo la unión entre secuencias comunes. Usando esta mezcla, se construyó el ADNc que codifica el receptor de TPO ligado al dominio Fc de la IgG1 por PCR usando el cebador de sentido directo (cebador 53) con sitios de restricción *EcoRI* y la secuencia líder del receptor de EPO y el cebador de sentido contrario (cebador 55) con sitios de restricción *XbaI* y extremo 3' del dominio Fc de la IgG. El producto de la PCR se cortó con *HindIII* y *XbaI* y se insertó en el vector de expresión PCR-3 para la producción de la proteína de fusión de receptor de TPO-Fc.

55

Tabla 5
Una lista de los cebadores usados en la construcción de los receptores de TPO y EPO fusionados con inmunoglobulina

	Cebador nº		Secuencia de nucleótidos	Secuencia nº
receptor de EPO	51	Sentido directo	5'-CGGAATTCATGGACCACCTCGGGGCG-3'	54
	52	Sentido contrario	5'-GCTCTAGACTAAGAGCAAGCCACATAGCTGGG-3'	55
receptor de TPO	53	Sentido directo	5'-CCCAAGCTTATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC-3'	56
	54	Sentido contrario	5'-GGAATTCCTACCCCTCCTGAGACAGATTCTGG-3'	57
IgG1-R-XbaI	55		5'-GCTCTAGAGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'	58

5

B. Construcción de ADN que codifica receptores de G-CSF y GH

- El ADNc que codifica el receptor de G-CSF se construyó por la PCR usando el cebador de sentido directo (cebador 56) con sitio de restricción de *HindIII* y la secuencia líder del receptor de G-CSF y el cebador de sentido contrario (cebador 57) con el sitio de restricción de *EcoRI* y la secuencia que codifica el extremo 3' del receptor de G-CSF. El
- 10 ADNc que codifica el receptor de GH se construyó por la PCR usando el cebador de sentido directo (cebador 58) con sitio de restricción de *EcoRI* y la secuencia líder del receptor de G-CSF y el cebador de sentido contrario (cebador 59) con sitio de restricción de *SpeI* y la secuencia que codifica el extremo 3' del receptor de G-CSF.
- 15 El producto de la PCR que codifica el receptor de G-CSF se digirió con *HindIII* y *EcoRI* y se clonó insertándolo en un vector de clonación disponible en el comercio, pBluescript KS II(+), en el sitio *HindIII/EcoRI*. El producto de la PCR que codifica el receptor de GH se digirió con *EcoRI* y *SpeI*, y se clonó insertándolo en un vector de clonación disponible en el comercio, pBluescript KS II(+), en el sitio *EcoRI/SpeI*.
- 20 El dominio Fc de la IgG se construyó por la PCR usando el cebador de sentido directo (cebador 60 para G-CSF, cebador 61 para GH) con la secuencia que codifica parte del extremo 5' de la región bisagra de la IgG humana y el cebador de sentido contrario (cebador 62). Para el receptor G-CSF, el producto de la PCR que codifica el dominio Fc de la IgG humana se digirió con *EcoRI* y *XbaI*, y se clonó insertándolo en un vector de clonación disponible en el comercio, pBluescript KS II(+), en el sitio *EcoRI/XbaI*. Para el receptor de GH, el producto de la PCR que codifica el
- 25 dominio Fc de la IgG humana se digirió con *SpeI* y *XbaI*, y se clonó insertándolo en un vector de clonación disponible en el comercio, pBluescript KS II(+), en el sitio *SpeI/XbaI*.

- Tanto el ADNc clonado que codifica el receptor de G-CSF como el dominio de Fc clonado de la IgG humana se digirieron con *EcoRI/XbaI* y después se ligaron para preparar el ADN que codifica el receptor de G-CSF ligado al
- 30 dominio Fc de la IgG humana. Esta construcción de ADN se cortó con *HindIII* y *XbaI* y se insertó en el vector de expresión PCR-3. Tanto el ADNc clonado que codifica el receptor de GH como el dominio de Fc clonado de la IgG humana se digirieron con *SpeI/XbaI* y después se ligaron para preparar el ADN que codifica al receptor de G-CSF ligado al dominio Fc de la IgG humana. Esta construcción de ADN se cortó con *EcoRI* y *XbaI* y se insertó en el vector de expresión PCR-3.

35

Tabla 6
Una lista de los cebadores usados en la construcción de los receptores de G-CSF y GH fusionados con inmunoglobulina

	Cebador nº		Secuencia de nucleótidos	Secuencia nº
receptor de G-CSF	56	Sentido directo	5'-CCCAAGCTTATGGCTGGACCTGCCACCC-3'	59
	57	Sentido contrario	5'-GGAATTTCGCAACAGAGCCAGGCAGTTCCA-3'	60
receptor de GH	58	Sentido directo	5'-CGGAATTCATGGATCTCTGGCAGCTG-3'	61
	59	Sentido contrario	5'-GGACTAGTTTGGCTCATCTGAGGAAGTG-3'	62
IgG1-F- EcoRI	60	Sentido directo	5'-GGAATTCGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAGTC-3'	63
IgG1-F-SpeI	61	Sentido directo	5'-GACTAGTGCAGAGCCCAAATCTTGTGA-3'	64
IgG1-R- XbaI	62	Sentido contrario	5'-GCTCTAGAGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'	65

5 **Ejemplo 5.** Medición de la afinidad de unión de citoquinas y sus muteínas a cada uno de sus receptores usando ELISA

A. Unión de la TPO y muteínas de TPO al receptor de TPO

- 10 Se usaron los líquidos sobrenadantes de cultivo de células CHO transfectadas con vectores de expresión que llevan genes para las muteínas de la TPO para medir las interacciones de citoquina-receptor.

La proteína de fusión de receptor de TPO-Ig se purificó del líquido sobrenadante del cultivo de células CHO transfectadas con el vector de expresión recombinante que lleva el gen que codifica la proteína de fusión de receptor de TPO-Fc usando una columna de Proteína A-Sepharose-4B (Pharmacia, Suecia). La proteína de fusión purificada diluida a 10 µg/ml con tampón de recubrimiento [bicarbonato sódico 0,1 M, (pH 9,6)] se añadió a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Falcon, EE.UU.) hasta 100 µl por pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó con Tween-20 al 0,1% en 1X PBS[PBST] 3 veces. Después de lavar, la placa se incubó con 200 µl de tampón de bloqueo (FBS al 1%, sacarosa al 5%, azida sódica al 0,05%) durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavó 3 veces con PBST.

Después de lavar, los líquidos sobrenadantes de los cultivos que consistían en 4 muteínas de TPO y una TPO natural, respectivamente, se diluyeron de forma seriada con tampón de dilución [BSA al 0,1%, Tween-20 al 0,05%, 1X PBS] y se añadieron a una placa de 96 pocillos recubierta con la proteína de fusión de receptor de TPO-Fc y se incubaron durante 1 h. El lavado se repitió 3 veces con PBST. Se diluyeron de la misma forma una TPO humana recombinante [Calbiochem, EE.UU.] como control positivo y los líquidos sobrenadantes cultivados de CHO-K1 transfectadas como control negativo. Las placas se lavaron 3 veces con PBST. Se añadió un anticuerpo de cabra dirigido contra TPO humana biotinilado (R&D, EE.UU.) diluido a 0,2 µg/ml con tampón de dilución, a la placa de 96 pocillos hasta 100 µl por pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBST. Se añadieron 100 µl por pocillo de estreptavidina-HRP (R&D, EE.UU.), diluida a 1:200 en tampón de dilución, a la placa de 96 pocillos y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBST después de 1 h. La reacción de coloración se llevó a cabo usando el sistema de sustrato de peroxidasa TMB en micropocillo (KPL, EE.UU.) y se leyó la D.O. a 630 nm con un lector de microplaca [BIO-RAD, modelo 550].

- 35 La afinidad de unión de TPO-[F141V] y TPO-[F131V] al receptor de TPO aumentó comparado con la TPO natural (figura 4a). La primera muteína tenía la afinidad de unión más fuerte entre todas las muteínas de TPO.

B. Unión de EPO y muteínas de EPO al receptor de EPO

- 40 La medición de la afinidad de unión de la EPO natural y las muteínas al receptor era básicamente similar a la de la afinidad de unión de la TPO y muteínas de TPO al receptor de TPO.

La afinidad de unión de EPO-[F148V] y EPO-[F142V] al receptor de EPO aumentó comparado con la EPO natural (figura 4b). Y la primera muteína tenía la afinidad de unión más fuerte entre todas las muteínas de EPO.

C. Unión de G-CSF y muteínas de G-CSF al receptor de G-CSF

5

La medición de la afinidad de unión del G-CSF natural y las muteínas al receptor era básicamente similar a la de la afinidad de unión de la TPO y muteínas de TPO al receptor de TPO.

Los resultados (figura 4c) mostraron que la afinidad de unión de G-CSF-[F140V], G-CSF-[F144V] y G-CSF-[F160V] al receptor de G-CSF aumentó comparado con el G-CSF natural. Y la primera muteína (G-CSF-[F140V]) tenía la afinidad de unión más fuerte entre todas las muteínas de G-CSF.

10

D. Unión de GH y muteínas de GH al receptor de GH

La medición de la afinidad de unión del GH natural y las muteínas al receptor era básicamente similar a la de la afinidad de unión de la TPO y muteínas de TPO al receptor de TPO.

Los resultados (figura 4d) mostraron que GH-[F139V] tenía la afinidad de unión más fuerte al receptor de GH.

20 **Ejemplo 6.** Medición de las uniones de citoquinas y sus muteínas a cada uno de sus receptores usando la SPR

A. Unión de la TPO y muteínas de TPO al receptor de TPO.

Para medir la afinidad de unión de TPO-[F141V] y TPO-[F131V] al receptor de TPO, se llevó a cabo la SPR en un instrumento BIAcore 3000 que contiene el chip Sensor CM5. Se inmovilizó el anticuerpo dirigido contra IgG humana en cada una de las celdas de flujo 1 y 2 usando la química de acoplamiento de amina. Para inactivar cualquier grupo activo, las superficies se bloquearon con etanolamina 1 M. Se añadió la proteína de fusión de receptor de TPO-Fc para unirse al anticuerpo dirigido contra IgG humana durante 2 min, con 30 μ l/min y después se hicieron reaccionar la TPO y muteínas de TPO para unirse al receptor de TPO.

30

Con la misma densidad de ligando, el aumento de la unidad de resonancia (RU) significa mayores afinidades de unión. En la figura 5a, la TPO natural, TPO-[F141V] y TPO-[F131V] tenían 10 RU, 30 RU y 20 RU, respectivamente. Este resultado mostró que TPO-[F141V] tenía la afinidad de unión más fuerte. Además los valores de K_D de la TPO natural y muteína se muestran en la tabla 7.

35

Tabla 7
Cambios en la constante de la velocidad de la cinética de unión de la TPO natural y muteína

	$K_{on}(M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$K_{off}(s^{-1}) \times 10^{-2}$	$K_D(\mu M) = K_{off}/K_{on}$	χ^2	Afinidad de unión relativa
TPO natural	2,42	13,7	5,66	5,81	1
TPO-[F141V]	12,8	0,51	0,04	6,03	141

B. Muteínas de EPO

40

Se realizó la SPR para medir las afinidades de unión de la muteína EPO-[F148V] y EPO-[F142V] con el receptor de EPO. El procedimiento experimental era similar al de la TPO.

La figura 5b es el resultado de la SPR de la EPO natural y muteínas. En la figura 5b, EPO-[F148V] mostró 40 RU y EPO-[F142V] 30 RU. Estos resultados muestran que la EPO-[F148V] tenía la afinidad de unión más fuerte. Además, los valores de K_D de las muteínas de EPO se muestran en la tabla 8.

45

Tabla 8
Cambios en la constante de la velocidad de la cinética de unión de la EPO natural y muteína

	$K_{on}(M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$K_{off}(s^{-1}) \times 10^{-2}$	$K_D(\mu M) = K_{off}/K_{on}$	χ^2	Afinidad de unión relativa
EPO natural	1,84	8,83	4,80	4,55	1
EPO-[F148V]	14,0	0,64	0,05	2,26	105

50

Ejemplo 7. Medición de las afinidades de unión de citoquinas naturales y muteínas usando FACSA. Establecimiento de la línea celular TF-1/*c-Mpl*

- 5 Se estableció la línea celular TF-1/*c-Mpl* transfectando ADNc que codifica *c-Mpl* en células TF-1. La expresión de *c-Mpl* se verificó usando análisis FACS. Se lavaron las células TF-1/*c-Mpl* 1×10^6 /ml con tampón de PBS y se incubó anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra IgG humana *c-Mpl* (BD PharMingen, EE.UU.) con las células TF-1/*c-Mpl*. Y después se añadió anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugado con FITC (molécula entera; Sigma, EE.UU.) para verificar la expresión de *c-Mpl* en la superficie de las células TF-1/*c-Mpl*. Como resultado, la gráfica de las células TF-1/*c-Mpl* se desplazó hacia la derecha de la de las células TF-1. Este resultado mostraba que *c-Mpl*, receptor de TPO, era expresado en la célula TF-1/*c-Mpl*.

B. Análisis FACS de las muteínas de TPO

- 15 Las células TF-1/*c-Mpl* 1×10^6 /ml se suspendieron en tampón de PBS y se añadieron a la suspensión TPO natural y [F141V] y se incubaron a 4°C durante 30-60 minutos, respectivamente. Se añadió anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra TPO humana biotinilado (R&D, EE.UU.) a las células anteriores y se incubaron a 4°C durante 30-60 min. Se añadió estreptavidina-FITC (Sigma-EE.UU.) a las células anteriores y se incubaron a 4°C durante 30-60 minutos. Las células se lavaron 2 veces con tampón de PBS para separar la estreptavidina-FITC sin reaccionar. Las células se suspendieron en tampón de PBS y se realizó análisis por citometría de flujo a 488 nm usando un dispositivo EXCALIBUR (BD, EE.UU.).

- 25 En la figura 6a, la curva de unión de la TPO-[F141V] estaba desplazada hacia la derecha respecto a la de la TPO natural. Este resultado mostraba que la TPO-[F141V] tenía una afinidad de unión al receptor mucho más fuerte que la TPO natural.

C. Análisis FACS de muteínas de EPO

- 30 El procedimiento FACS de las muteínas de EPO se llevó a cabo de forma similar al de la TPO.

En la figura 6b, la curva de unión de la EPO-[F148V] estaba desplazada hacia la derecha respecto a la de la TPO natural. Este resultado mostraba que la TPO-[F141V] tenía una afinidad de unión al receptor mucho más fuerte que la EPO natural.

- 35 **Ejemplo 8.** Medición de las actividades biológicas de muteínas de TPO, EPO, G-CSF y GH

A. Ensayo de proliferación celular de las muteínas de TPO

- 40 Para investigar las diferencias de la proliferación celular y las actividades biológicas entre la TPO natural y las muteínas, se usó la línea celular TF-1/*c-Mpl* producida antes. Las células TF-1/*c-Mpl* se cultivaron en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%, GM-CSF 1 ng/ml a 37°C, CO₂ al 5%. Se sembraron TPO natural y de cada una de las muteínas 0,4, 1, 5, 10, 20, 40, 75 ng/ml en RPMI-1640 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (FALCON, EE.UU.). Se añadieron 1×10^4 células de las células TF-1/*c-Mpl* en RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10% a cada uno de los pocillos de la placa de 96 pocillos. Después de 4 días de cultivo a 37°C, CO₂ al 5%, se añadieron 20 µl de disolución de MTS [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna, MTS] y el etosulfato de fenazina (PES; promega) y se incubaron durante 4 horas. Se leyó la D.O. con un lector de micoplaca (BIO-RAD Modelo 550) a 490 nm.

- 50 La figura 7a muestra diferencias de la TPO natural y las muteínas en la estimulación de la proliferación celular de TF-1/*c-Mpl*. Se aplicó TPO a las TF-1/*c-Mpl* desde 0,4 ng/ml a 75 ng/ml. La proliferación celular aumentó hasta una concentración de TPO de 50 ng/ml. El potencial de proliferación celular de TF-1/*c-Mpl* de TPO-[F141V] era mucho más fuerte que el de la natural y era la primera en actividad biológica entre las muteínas. La actividad biológica de TPO-[F131V] era la segunda más fuerte entre las muteínas de TPO. La actividad de la TPO-[F46V] era similar a la de la natural.

B. Ensayo de proliferación celular de muteínas de EPO

La actividad biológica de las muteínas de EPO se examinó por el ensayo de proliferación celular usando células TF-

1 dependientes de EPO. El procedimiento experimental del ensayo de proliferación celular de las muteínas de EPO era similar al de las muteínas de TPO.

La figura 7b muestra las diferencias de la EPO natural y las muteínas en la estimulación de la proliferación de células TF-1. Se aplicó EPO a las células TF-1 desde 0,01 UI/ml a 7 UI/ml. El potencial de proliferación de células TF-1 de EPO-[F148V] era mucho más fuerte que el de la natural y era la primera en fuerza biológica entre las muteínas de EPO. Las actividades biológicas de EPO-[F142V] y EPO-[F138V] eran la segunda y tercera más fuertes entre las muteínas de EPO, respectivamente.

10

Tabla 9
Actividades biológicas de las TPO

	TPO	Comparación de la actividad máxima (%)
Natural		100
Muteínas	TPO-[F46V]	107
	TPO-[F128V]	63
	TPO-[F131V]	119
	TPO-[F141V]	146

Tabla 10
Actividades biológicas de las EPO

	EPO	Comparación de la actividad máxima (%)
Natural		100
Muteínas	EPO-[F48V]	84
	EPO-[F138V]	57
	EPO-[F142V]	122
	EPO-[F148V]	137

15

C. Muteínas de G-CSF

La actividad biológica de las muteínas de G-CSF se examinó por el ensayo de proliferación celular usando células HL-60 dependientes de G-CSF. El procedimiento experimental del ensayo de proliferación celular de las muteínas de G-CSF era similar al de las muteínas de TPO.

La figura 7c muestra las diferencias del G-CSF natural y las muteínas en la estimulación de la proliferación de células HL-60. Se aplicó G-CSF a las células HL-60 desde 0,4 ng/ml a 75 ng/ml. El potencial de proliferación de células HL-60 de G-CSF-[F140V] era mucho más fuerte que el del natural y era la primera en fuerza biológica entre las muteínas de G-CSF.

D. Muteínas de GH

La actividad biológica de las muteínas de GH se examinó por el ensayo de proliferación celular usando células NB2 dependientes de GH. El procedimiento experimental del ensayo de proliferación celular de las muteínas de GH era similar al de las muteínas de GH.

La figura 7d muestra las diferencias del GH natural y las muteínas en la estimulación de la proliferación de células NB2. Se aplicó GH a las células NB2 desde 0,4 ng/ml a 75 ng/ml. El potencial de proliferación de células NB2 de GH-[F139V] era mucho más fuerte que el de la natural y era la primera en fuerza biológica entre las muteínas de GH.

Ejemplo 9. Perfiles farmacocinéticos de EPO y TPO naturales y muteínas

Se investigó la diferencia de los perfiles farmacocinéticos entre cada una de las muteínas de EPO y TPO y las naturales. Se inyectó TPO o muteínas de EPO por vía intravenosa a conejos (blancos de Nueva Zelanda, 3 kg). Después se recogieron muestras de sangre de forma seriada. Las concentraciones de EPO y TPO de cada muestra se detectaron usando ensayo ELISA cuantitativo como se ha descrito antes. La inyección de las EPO en ratones (12 semanas, Balb/c, 30 g) se realizó tanto por vía intraperitoneal como intravenosa. Las muestras de sangre en tubos que contenían heparina se separaron por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. El líquido sobrenadante que contenía plasma se usó para detectar las concentraciones en la sangre de EPO y TPO usando ELISA.

En la figura 8a se muestran los perfiles de concentración plasmática de TPO natural y -[F141V] después de inyección intravenosa de TPO natural y -[F141V] 5 µg/kg en conejos. La concentración de TPO-[F141V] disminuía más rápidamente que la de la TPO natural. La TPO-[F141V] se desplazó de la sangre a los tejidos diana periféricos rápidamente, debido a su afinidad de unión más fuerte por el receptor.

5

En la figura 8b se muestran los perfiles de concentración plasmática de EPO natural y EPO-[F148V] en la sangre después de inyección intravenosa de EPO natural y EPO-[F148V] 1000 UI/kg en conejos. La concentración de EPO-[F148V] disminuía más rápidamente que la de la EPO natural.

- 10 En la figura 8c se muestran los perfiles de concentración plasmática después de inyección intraperitoneal de EPO natural y EPO-[F148V] 20 UI/g en ratones. La velocidad de difusión de la EPO natural era mayor que la de la EPO-[F148V] en una etapa temprana y la concentración máxima en la sangre ($C_{\text{máx}}$) de la EPO natural también era mayor que la de la EPO-[F148V]. La $C_{\text{máx}}$ de la EPO-[F148V] permanecía más tiempo que la de la EPO natural. Estos resultados sugerían que la EPO-[F148V] era más hidrófoba y tenía una afinidad de unión mayor al receptor que la EPO natural. Y estos resultados conducen a la conclusión de que la EPO-[F148V] se difundía en la sangre más lentamente y se desplazaba de la sangre a los tejidos diana periféricos más rápidamente que la EPO natural.

Tabla 11
Parámetros farmacocinéticos de la EPO natural y la muteína EPO-[F148V]

	Ratón		Conejo	
	EPO natural	muteína EPO-[F148V]	EPO natural	muteína EPO-[F148V]
$T_{1/2}$ (semivida)	1,9	1,4	3,8	2,4
AUC	100	78	100	80

20

Ejemplo 10. Actividades in vivo de las muteínas de EPO

La diferencia de las actividades biológicas entre la EPO natural y las muteínas se verificó en ratones. Ratones (Balb/c de 12 semanas, 20 g, Jungang Lab Animal Inc., Corea) se trataron con radiación γ a 700 Rad. Se inyectaron 250 ng de EPO natural y muteínas purificadas en 50 µl de PBS por vía intraperitoneal 3 veces al día. Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola. Y después se ensayaron los parámetros hematológicos de acuerdo con el ensayo de CBC común. La EPO natural se usó como control positivo y el líquido sobrenadante del cultivo de células CHO se usó como control negativo. Se recogió la sangre en tubos que contenían EDTA los días 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 25 y 30 después de inyección.

30

La figura 9 muestra los resultados del CBC en ratones a los que se había inyectado por vía intraperitoneal EPO natural y muteínas para verificar el cambio en el recuento de RBC y reticulocitos. El aumento del recuento de RBC (figura 9a) era mucho más notable en los ratones a los que se había inyectado EPO-[F148V] que en los ratones a los que se había inyectado EPO natural. Y los RBC aumentaron en los ratones a los que se había inyectado EPO-[F148V] y EPO-[F138V] más débilmente que en los ratones a los que se había inyectado EPO natural. El aumento del recuento de reticulocitos (figura 9b) y hematocrito era similar a los resultados del cambio en el recuento de RBC en los ratones a los que se había inyectado EPO-[F148V].

35

Ejemplo 11. Actividades in vivo de las muteínas de TPO

40

La diferencia de las actividades biológicas entre la TPO natural y las muteínas se estudió en ratones. Ratones (Balb/c de 12 semanas, 20 g, Jungang Lab Animal Inc., Corea) se trataron con radiación γ a 700 Rad. Se inyectaron 250 ng de TPO natural y muteínas purificados en 50 µl de PBS por vía intraperitoneal 3 veces al día. Se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola. Y después se ensayaron los parámetros hematológicos de acuerdo con el ensayo de CBC común. La TPO natural se usó como control positivo y el líquido sobrenadante del cultivo de células CHO se usó como control negativo. Se recogió la sangre en tubos que contenían EDTA los días 0, 1, 4, 7, 10, 14, 18, 23, 28 y 32 después de inyección.

45

La figura 10 muestra los cambios del recuento de plaquetas (figura 10a), recuento de leucocitos (figura 10b) y recuento de neutrófilos (figura 10c) en ratones a los que se había inyectado por vía intraperitoneal TPO natural y muteínas. El aumento del recuento de plaquetas era el más notable en los ratones a los que se había inyectado TPO-[F141V]. Y los ratones a los que se había inyectado TPO-[F131V] eran los segundos mayores. Los ratones a los que se había inyectado TPO-[F46V] eran similares a los que se había inyectado TPO natural. Y los ratones a los que se había inyectado TPO-[F128V] mostraron un recuento de plaquetas similar al de los controles negativos a los

50

que se había inyectado PBS (figura 10a). El aumento del recuento de leucocitos (figura 10b) y recuento de neutrófilos (figura 10c) mostró patrones similares a los vistos en el cambio en las plaquetas.

Aplicabilidad industrial

- 5 Como es evidente a partir de los resultados anteriores de la presente invención, la sustitución del resto fenilalanina por valina, que está presente en un dominio que participa en la unión de las proteínas naturales moduladoras de la respuesta biológica a los correspondientes receptores, ligandos o sustratos, conduce a un aumento en la afinidad de unión y la actividad biológica, y reduce la producción de autoanticuerpos frente a variantes de proteínas
10 convencionales, haciendo posible producir mejores fármacos proteínicos.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> MEDEXGEN Inc.
15 CHUNG, Yong-Hoon
LEE, Hak-sup
YI, Ki-Wan
HEO, Youn-Hwa
KIM, Jae-Youn
- 20 <120> Un procedimiento para mejorar la eficacia de las proteínas modificadoras de la respuesta biológica y muteínas ilustrativas
<150> KR10-2003-0051846
<151> 2003-07-26
<160> 65
- 25 <170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 200
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> CNTF: la Phe 3^a, 83^a, 98^a, 105^a, 119^a, 152^a o 178^a se sustituye por Val.
<400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Phe | Thr | Glu | His | Ser | Pro | Leu | Thr | Pro | His | Arg | Arg | Asp | Leu |
| 1 | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cys | Ser | Arg | Ser | Ile | Trp | Leu | Ala | Arg | Lys | Ile | Arg | Ser | Asp | Leu | Thr |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Leu | Thr | Glu | Ser | Tyr | Val | Lys | His | Gln | Gly | Leu | Asn | Lys | Asn | Ile |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Leu | Asp | Ser | Ala | Asp | Gly | Met | Pro | Val | Ala | Ser | Thr | Asp | Gln | Trp |
| | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | |

Ser Glu Leu Thr Glu Ala Glu Arg Leu Gln Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
65 70 75 80

Arg Thr Phe His Val Leu Leu Ala Arg Leu Leu Glu Asp Gln Gln Val
85 90 95

His Phe Thr Pro Thr Glu Gly Asp Phe His Gln Ala Ile His Thr Leu
100 105 110

Leu Leu Gln Val Ala Ala Phe Ala Tyr Gln Ile Glu Glu Leu Met Ile
115 120 125

Leu Leu Glu Tyr Lys Ile Pro Arg Asn Glu Ala Asp Gly Met Pro Ile
130 135 140

Asn Val Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu Lys Lys Leu Trp Gly Leu Lys
145 150 155 160

Val Leu Gln Glu Leu Ser Gln Trp Thr Val Arg Ser Ile His Asp Leu
165 170 175

Arg Phe Ile Ser Ser His Gln Thr Gly Ile Pro Ala Arg Gly Ser His
180 185 190

Tyr Ile Ala Asn Asn Lys Lys Met
195 200

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> EPO: la Phe 48^a, 138^a, 142^a o 148^a se sustituye por Val.

<400> 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110

Arg Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
165

<210> 3

<211> 209

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Flt3L: la Phe 6^a, 15^a, 81^a, 87^a, 96^a o 124^a se sustituye por Val.

<400> 3

```

Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe Ala
  1              5              10              15

Val Lys Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val
      20              25              30

Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp
      35              40              45

Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala
      50              55              60

Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His
      65              70              75              80

Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe
      85              90              95

Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu
      100             105             110

Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu
      115             120             125

Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser
      130             135             140

Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu
      145             150             155             160

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala
      165             170             175

Trp Cys Leu His Trp Gln Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly
      180             185             190

Glu Gln Val Pro Pro Val Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val Glu
      195             200             205

```

His

<210> 4

<211> 174

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> G-CSF: la Phe 13^a, 83^a, 113^a, 140^a, 144^a o 160^a se sustituye por Val.

5 <400> 4

Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys
1				5					10					15	

Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln
			20					25						30	

Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val
		35					40					45			

Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Cys
	50					55					60				

Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser
65					70					75					80

Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser
				85					90					95	

Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp
		100					105						110		

Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro
		115					120					125			

Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala	Phe
	130					135					140				

Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe
145					150					155					160

Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro		
					165					170					

<210> 5

<211> 127

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GM-CSF: la Phe 47^a, 103^a, 106^a, 113^a o 119^a se sustituye por Val.

<400> 5

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
20 25 30

Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 6

<211> 191

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GH: la Phe 1^a, 10^a, 25^a, 31^a, 44^a, 54^a, 92^a, 97^a, 139^a, 146^a, 166^a, 176^a o 191 se sustituye por Val.

<400> 6

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1 5 10 15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
180 185 190

<210> 7

<211> 165

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IFN-alfa 2A: la Phe 27^a, 36^a, 38^a, 43^a, 47^a, 64^a, 67^a, 84^a, 123^a o 151^a se sustituye por Val.

<400> 7

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
 165

<210> 8

<211> 165

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IFN-alfa 2B: la Phe 27^a, 36^a, 38^a, 43^a, 47^a, 64^a, 67^a, 84^a, 123^a o 151^a se sustituye por Val.

<400> 8

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 9

<211> 166

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IFN-beta: la Phe 8^a, 38^a, 50^a, 67^a, 70^a, 111^a o 154^a se sustituye por Val.

<400> 9

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Cys Gln
1 5 10 15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Arg Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Val Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Arg Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Arg Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Asp Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Val Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 10

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IFN-gamma: la Phe 18^a, 32^a, 55^a, 57^a, 60^a, 63^a, 84^a, 85^a, 95^a o 139^a se sustituye por Val.

<400> 10

Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe
20 25 30

Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met
35 40 45

Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys
50 55 60

Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met
65 70 75 80

Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu
85 90 95

Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala
100 105 110

Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys
115 120 125

Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg Arg Ala
130 135 140

Ser Gln
145

<210> 11

<211> 172

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IFN-omega: la Phe 27^a, 36^a, 38^a, 65^a, 68^a, 124^a o 153^a se sustituye por Val.

<400> 11

Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr Leu Val
 1 5 10 15

Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys Gly Ser Gln Leu
 35 40 45

Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ile
 50 55 60

Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asn Met Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Gln His Leu
 85 90 95

Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala
 100 105 110

Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu Arg Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg
 115 120 125

Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val
 130 135 140

Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu
 145 150 155 160

Arg Leu Arg Ser Lys Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser
 165 170

<210> 12

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IFN-tau: la Phe 8^a, 39^a, 68^a, 71^a, 88^a, 127^a, 156^a, 157^a, 159^a o 183^a se sustituye por Val.

<400> 12

Leu Asp Leu Lys Leu Ile Ile Phe Gln Gln Arg Gln Val Asn Gln Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Leu Asn Lys Leu Gln Thr Leu Ser Ile Gln Gln Cys
20 25 30

Leu Pro His Arg Lys Asn Phe Leu Leu Pro Gln Lys Ser Leu Ser Pro
35 40 45

Gln Gln Tyr Gln Lys Gly His Thr Leu Ala Ile Leu His Glu Met Leu
50 55 60

Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe Arg Ala Asn Ile Ser Leu Asp Gly Trp
65 70 75 80

Glu Glu Asn His Thr Glu Lys Phe Leu Ile Gln Leu His Gln Gln Leu
85 90 95

Glu Tyr Leu Glu Ala Leu Met Gly Leu Glu Ala Glu Lys Leu Ser Gly
100 105 110

Thr Leu Gly Ser Asp Asn Leu Arg Leu Gln Val Lys Met Tyr Phe Arg
115 120 125

Arg Ile His Asp Tyr Leu Glu Asn Gln Asp Tyr Ser Thr Cys Ala Trp
130 135 140

Ala Ile Val Gln Val Glu Ile Ser Arg Cys Leu Phe Phe Val Phe Ser
145 150 155 160

Leu Thr Glu Lys Leu Ser Lys Gln Gly Arg Pro Leu Asn Asp Met Lys
165 170 175

Gln Glu Leu Thr Thr Glu Phe Arg Ser Pro Arg
180 185

<210> 13

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-2: la Phe 42ª, 44ª, 78ª, 103ª, 117ª o 124ª se sustituye por Val.

<400> 13

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 14

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-3: la Phe 37^a, 61^a, 107^a, 113^a o 133^a se sustituye por Val.

<400> 14

Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys
1 5 10 15

Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln Pro Pro Leu
20 25 30

Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln Asp Ile Leu
35 40 45

Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe Asn Arg Ala
50 55 60

Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Asn
65 70 75 80

Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr Arg His Pro
85 90 95

Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr
100 105 110

Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr Leu
115 120 125

Ser Leu Ala Ile Phe
130

- <210> 15
<211> 129
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> IL-4: la Phe 33^a, 45^a, 55^a, 73^a, 82^a o 112^a se sustituye por Val.
<400> 15

His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
1 5 10 15

Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
20 25 30

Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
35 40 45

Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
50 55 60

Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
65 70 75 80

Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
85 90 95

Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
100 105 110

Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
115 120 125

Ser

<210> 16

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-5: la Phe 49ª, 69ª, 96ª o 103ª Phe se sustituye por Val.

<400> 16

Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
20 25 30

Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
35 40 45

Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
50 55 60

Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
65 70 75 80

Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe
85 90 95

Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile
100 105 110

Ile Glu Ser
115

<210> 17

<211> 183

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-6: la Phe 73^a, 77^a, 93^a, 104^a, 124^a, 169^a o 172^a Phe se sustituye por Val.

<400> 17

Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
1 5 10 15

Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu
20 25 30

Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
35 40 45

Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro
50 55 60

Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu
65 70 75 80

Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr
85 90 95

Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg
100 105 110

Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys
115 120 125

Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala
130 135 140

Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met
145 150 155 160

Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
180

<210> 18

<211> 197

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-12p35: la Phe 13^a, 39^a, 82^a, 96^a, 116^a, 132^a, 150^a, 166^a o 180^a se sustituye por Val.

<400> 18

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
1 5 10 15

His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
20 25 30

Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
35 40 45

His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
50 55 60

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
130 135 140

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160

Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190

Tyr Leu Asn Ala Ser
195

<210> 19

<211> 146

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LPT: la Phe 41ª o 92ª se sustituye por Val.

<400> 19

Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
20 25 30

Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35 40 45

Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
65 70 75 80

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85 90 95

His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 20

<211> 180

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LIF: la Phe 41^a, 52^a, 67^a, 70^a, 156^a o 180^a se sustituye por Val.

<400> 20

Ser Pro Leu Pro Ile Thr Pro Val Asn Ala Thr Cys Ala Ile Arg His
1 5 10 15

Pro Cys His Asn Asn Leu Met Asn Gln Ile Arg Ser Gln Leu Ala Gln
20 25 30

Leu Asn Gly Ser Ala Asn Ala Leu Phe Ile Leu Tyr Tyr Thr Ala Gln
35 40 45

10

Gly Glu Pro Phe Pro Asn Asn Leu Asp Lys Leu Cys Gly Pro Asn Val
50 55 60

Thr Asp Phe Pro Pro Phe His Ala Asn Gly Thr Glu Lys Ala Lys Leu
65 70 75 80

Val Glu Leu Tyr Arg Ile Val Val Tyr Leu Gly Thr Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ile Thr Arg Asp Gln Lys Ile Leu Asn Pro Ser Ala Leu Ser Leu His
100 105 110

Ser Lys Leu Asn Ala Thr Ala Asp Ile Leu Arg Gly Leu Leu Ser Asn
115 120 125

Val Leu Cys Arg Leu Cys Ser Lys Tyr His Val Gly His Val Asp Val
130 135 140

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

Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Lys Tyr Lys Gln Ile Ile Ala Val Leu
165 170 175

Ala Gln Ala Phe
180

<210> 21

<211> 522

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> M-CSF: la Phe 35^a, 37^a, 54^a, 67^a, 91^a, 106^a, 121^a, 135^a, 143^a, 229^a, 255^a, 311^a, 439^a, 466^a o 485^a se sustituye por Val.

<400> 21

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

210	215	220
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser		
225	230	235 240
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn		
245	250	255
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val		
260	265	270
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly		
275	280	285
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu		
290	295	300
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala		
305	310	315 320
Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro		
325	330	335
Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro		
340	345	350
Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro		
355	360	365
Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro		
370	375	380
Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly		
385	390	395 400
Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp		
405	410	415
Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala		
420	425	430

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
435 440 445

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
450 455 460

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
465 470 475 480

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
485 490 495

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
500 505 510

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
515 520

<210> 22

<211> 227

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OSM: la Phe 56^a, 70^a, 160^a, 169^a, 176^a o 184^a se sustituye por Val.

<400> 22

Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp
20 25 30

Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Glu His
35 40 45

Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly
50 55 60

Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly Cys
65 70 75 80

Val Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu Gln Arg Leu Pro Lys Ala Gln
85 90 95

Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln
100 105 110

Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu Gly Leu Arg Asn Asn Ile Tyr Cys Met
115 120 125

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

Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala Phe
145 150 155 160

Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg Phe
165 170 175

Met His Ser Val Gly Arg Val Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn
180 185 190

Arg Ser Arg Arg His Ser Pro His Gln Ala Leu Arg Lys Gly Val Arg
195 200 205

Arg Thr Arg Pro Ser Arg Lys Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly Gln
210 215 220

Leu Pro Arg
225

<210> 23
<211> 191
<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PL: la Phe 10^a, 31^a, 44^a, 52^a, 54^a, 92^a, 97^a, 146^a, 166^a, 176^a o 191^a se sustituye por Val.

<400> 23

Val Gln Thr Val Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp His Ala Met Leu Gln
 1 5 10 15

Ala His Arg Ala His Gln Leu Ala Ile Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30

Glu Thr Tyr Ile Pro Lys Asp Gln Lys Tyr Ser Phe Leu His Asp Ser
 35 40 45

Gln Thr Ser Phe Cys Phe Ser Asp Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Met
 50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Glu Ser Trp Leu Glu Pro Val Arg Phe Leu Arg Ser Met
 85 90 95

Phe Ala Asn Asn Leu Val Tyr Asp Thr Ser Asp Ser Asp Asp Tyr His
 100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
 115 120 125

Glu Asp Gly Ser Arg Arg Thr Gly Gln Ile Leu Lys Gln Thr Tyr Ser
 130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn His Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
 145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
 165 170 175

Leu Arg Met Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

<210> 24

<211> 248

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SCF: la Phe 63^a, 102^a, 110^a, 115^a, 116^a, 119^a, 126^a, 129^a, 158^a, 199^a, 205^a, 207^a o 245^a se sustituye por Val.

<400> 24

Glu	Gly	Ile	Cys	Arg	Asn	Arg	Val	Thr	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Val	Thr
1				5					10					15	
Lys	Leu	Val	Ala	Asn	Leu	Pro	Lys	Asp	Tyr	Met	Ile	Thr	Leu	Lys	Tyr
			20					25					30		
Val	Pro	Gly	Met	Asp	Val	Leu	Pro	Ser	His	Cys	Trp	Ile	Ser	Glu	Met
			35					40					45		
Val	Val	Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Ser
	50						55					60			
Asn	Ile	Ser	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Ile	Ile	Asp	Lys	Leu	Val
65						70					75			80	
Asn	Ile	Val	Asp	Asp	Leu	Val	Glu	Cys	Val	Lys	Glu	Asn	Ser	Ser	Lys
					85					90				95	
Asp	Leu	Lys	Lys	Ser	Phe	Lys	Ser	Pro	Glu	Pro	Arg	Leu	Phe	Thr	Pro
					100					105				110	
Glu	Glu	Phe	Phe	Arg	Ile	Phe	Asn	Arg	Ser	Ile	Asp	Ala	Phe	Lys	Asp

115	120	125
Phe Val Val Ala Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu		
130	135	140
Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu		
145	150	155
Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn		
165	170	175
Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala		
180	185	190
Met Ala Leu Pro Ala Leu Phe Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly		
195	200	205
Ala Leu Tyr Trp Lys Lys Arg Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu		
210	215	220
Asn Ile Gln Ile Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu		
225	230	235
Lys Glu Arg Glu Phe Gln Glu Val		
245		

<210> 25

<211> 332

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TPO: la Phe 46^a, 128^a, 131^a, 141^a, 186^a, 204^a, 240^a o 286^a se sustituye por Val.

<400> 25

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu
1				5					10					15	

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

Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly Thr Arg Gly Leu Phe
225 230 235 240

Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro Asp Ile Ser Ser Gly
245 250 255

Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu Gln Pro Gly Tyr Ser
260 265 270

Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr Thr Leu Phe Pro Leu
275 280 285

Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu His Pro Leu Leu Pro
290 295 300

Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser Pro Leu Leu Asn Thr
305 310 315 320

Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu Gly
325 330

<210> 26

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador 1

<400> 26

cggaattccg atggagctga ctgaattg

28

10 <210> 27

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador 2

<400> 27

tttagcggcc gcattcttac ccttcctgag

30

<210> 28

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador 4

<400> 28

ccaagctaac gtccacagca g

21

25

<210> 29

<211> 17

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 6	
	<400> 29	
	gctcaggacg atggcat	17
5	<210> 30	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador 8	
	<400> 30	
	ggtggttgac gctcaggaag atg	23
	<210> 31	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 10	
20	<400> 31	
	catcaggaca cgcacctttc c	21
	<210> 32	
	<211> 17	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 11	
	<400> 32	
	ggcgcggaga tgggggt	17
30	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador 12	
	<400> 33	
	tggtcatctg tcccctgtcc tg	22
	<210> 34	
	<211> 24	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 14	
	<400> 34	
	gacattaact ttggtgtctg ggac	24
45	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador 15	
	<400> 35	
	ctgtccgcaa actcttccga g	21

<210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador 17
 <400> 36
 cgcaaaactcg tccgagtcta ct 22
 <210> 37
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 19
 15 <400> 37
 gagtctactc caatgtggtg gg 22
 <210> 38
 <211> 31
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 21
 <400> 38
 ccccgggacc atggctggac ctgccaccca g 31
 25 <210> 39
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> cebador 22
 <400> 39
 cgaattcgct cagggctggg caaggag 27
 <210> 40
 <211> 18
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 24
 <400> 40
 40 **acttgagcag gacgctct** 18
 <210> 41
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador 25
 <400> 41
 agcggccttg tctctta 17
 <210> 42
 50 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 27
 55 <400> 42

	gacgttgcca ccaccat	17
	<210> 43	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 29	
	<400> 43	
	gccgtcgcct ctgcttt	17
10	<210> 44	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador 31	
	<400> 44	
	tcgccttctg ctgtccag	18
	<210> 45	
	<211> 17	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 33	
	<400> 45	
	tctgcaagac gtcctgg	17
25	<210> 46	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador 35	
	<400> 46	
	cttttggcct gctctgcctg tcctggcttc aagagggcag tgccttccca accattccct	60
	tatc	64
	<210> 47	
35	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 37	
40	<400> 47	
	ggaattcatg gctgcaggct cccggacgtc cctgctcctg gcttttggcc tgctctgcct	60
		60
	<210> 48	
	<211> 25	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 40	
	<400> 48	
	ggggttctgc aggactgaat acttc	25
50	<210> 49	

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> cebador 42		
	<400> 49		
	ggctgttggc gacgacctg	20	
	<210> 50		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 44		
	<400> 50		
15	gtaggctctgc ttgacgatct gccacg	26	
	<210> 51		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> cebador 46		
	<400> 51		
	gagtttgtgt cgaccttgct gtag	24	
	<210> 52		
25	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 48		
30	<400> 52		
	gtccttcctg acgcagtaga gcag	24	
	<210> 53		
	<211> 28		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 50		
	<400> 53		
	cgatgcgcag gactgtctcg accttgct	28	
40	<210> 54		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> cebador 51		
	<400> 54		
	cggaattcat ggaccacctc ggggcg	26	
	<210> 55		
	<211> 32		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 52		
	<400> 55		
55	gctctagact aagagcaagc cacatagctg gg	32	
	<210> 56		

	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> cebador 53		
	<400> 56		
	cccaagctta tggagctgac tgaattgctc ctc	33	
	<210> 57		
	<211> 32		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 54		
	<400> 57		
15	ggaattctta cccttcctga gacagattct gg	32	
	<210> 58		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> cebador 55		
	<400> 58		
	gctctagagc tcatttacct ggagacaggg agag	34	
	<210> 59		
25	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 56		
30	<400> 59		
	cccaagctta tggctggacc tgccacct	28	
	<210> 60		
	<211> 29		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 57		
	<400> 60		
	ggaattcgca acagagccag gcagttcca	29	
40	<210> 61		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> cebador 58		
	<400> 61		
	cggaattcat ggatctcttg cagctg	26	
	<210> 62		
	<211> 28		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador 59		
	<400> 62		
	ggactagttt ggctcatctg aggaagtg	28	
55			

<210> 63
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador 60
 <400> 63
 ggaattcgca gagcccaaatt cttgtgacaa aactc 35
 <210> 64
 10 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 61
 15 <400> 64
 gactagtgca gagcccaaatt cttgtga 27
 <210> 65
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 62
 <400> 65
 gctctagagc tcattttaccc ggagacaggg agag 34
 25

REIVINDICACIONES

1. Variante de citoquina de haz de 4 hélices α , caracterizada por la sustitución de fenilalanina por valina en el dominio de unión de la citoquina.
- 5 2. La variante de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la citoquina de haz de 4 hélices α se selecciona del grupo que consiste en CNTF, EPO, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, GH, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO, IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω e IFN- τ .
- 10 3. La variante de proteína de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el CNTF, EPO, G-CSF, GM-CSF, GH, IL-4, IL-6, IL-12p35, LIF, OSM, PL y TPO se alteran sustituyendo un resto de fenilalanina por valina de los restos de aminoácidos entre las posiciones 110 y 180.
4. La variante de proteína de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω e IFN- τ se alteran sustituyendo un resto de fenilalanina por valina de los restos de aminoácidos entre las posiciones 1 y 50.
- 15 5. La variante de proteína de acuerdo con la reivindicación 2, en la que
 - 20 - el CNTF se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 119, 152 o 178 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 1;
 - la EPO se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 138, 142 o 148 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 2;
 - 25 - el Flt3L se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 124 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 3;
 - el G-CSF se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 113, 140, 144 o 160 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 4;
 - 30 - el GM-CSF se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 113 o 119 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 5;
 - 35 - la GH se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 139, 146, 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 6;
 - la IL-2 se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 42 o 44 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 13;
 - 40 - la IL-3 se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 107 o 113 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 14;
 - la IL-4 se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 112 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 15;
 - 45 - la IL-5 se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 69 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 16;
 - 50 - la IL-6 se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 124, de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 17;
 - la IL-12p35 se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 180 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 18;
 - 55 - la LPT se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 92 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 19;
 - el LIF se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 156 de una secuencia de

aminoácidos designada SEQ ID NO: 20;

- el M-CSF se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 311 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 21;

5

- la OSM se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 160 o 169 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 22;

- la PL se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 166 o 176 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 23;

10

- el SCF se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 199, 205 o 207 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 24;

- la TPO se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 131 o 141 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 25;

15

- el IFN- α 2A se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 7;

20

- el IFN- α 2B se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 8;

- el IFN- β se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 38 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 9;

25

- el IFN- γ se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 32 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 10;

- el IFN- θ se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 27, 36 o 38 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 11;

30

- el IFN- τ se altera sustituyendo el resto de fenilalanina por valina en una posición 39 de una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 12.

35

6. Un ADN que codifica la variante de proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un vector de expresión recombinante al que está operativamente unido el ADN de acuerdo con la reivindicación 6.

40

8. El vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el vector de expresión recombinante tiene un número de acceso KCCM-10500, KCCM-10501 o KCCM-10571.

9. Una célula huésped transformada o transfectada con el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

45

10. Un procedimiento para preparar una variante de proteína, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 9 y aislar la variante de proteína de un cultivo resultante.

50

11. Una composición farmacéutica que comprende la variante de proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1A

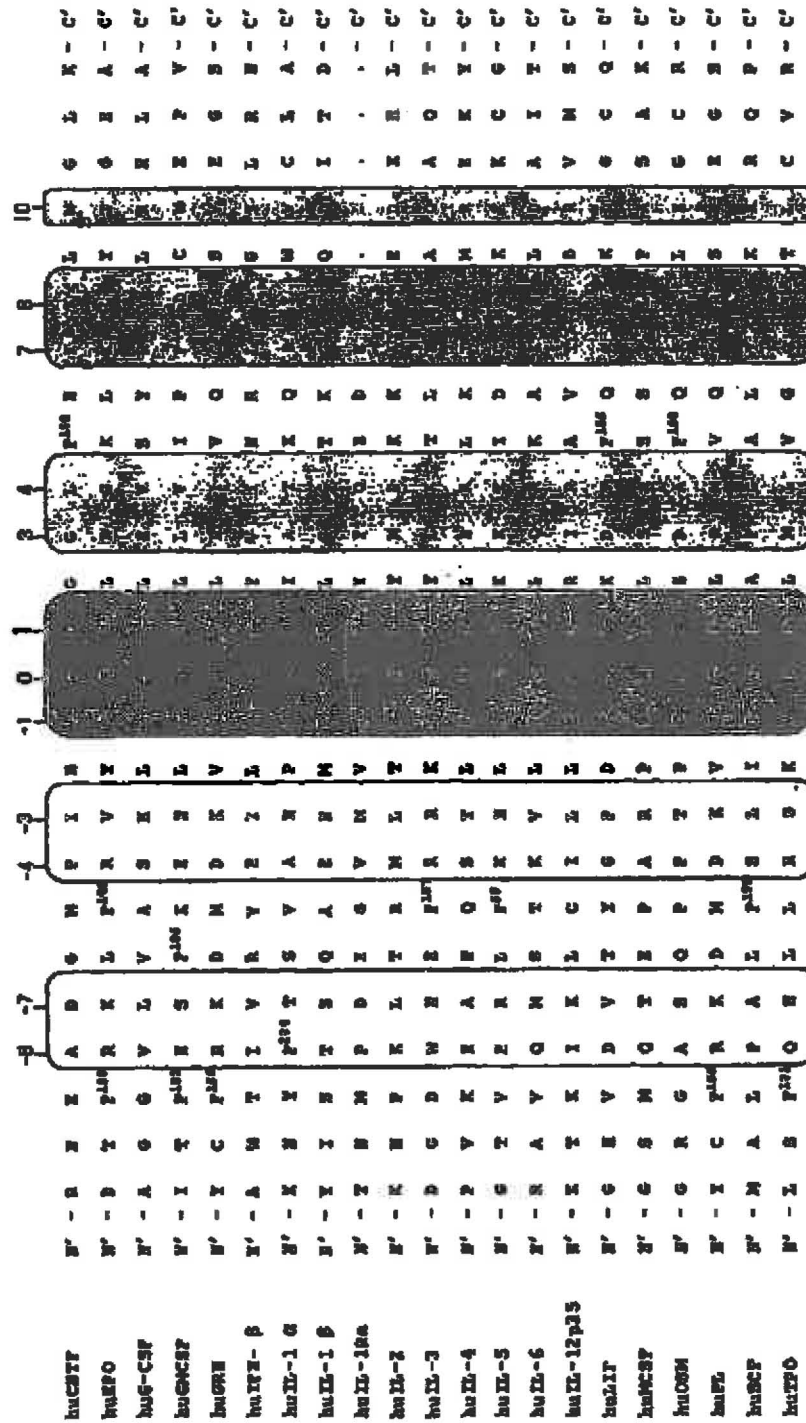


FIG. 2A

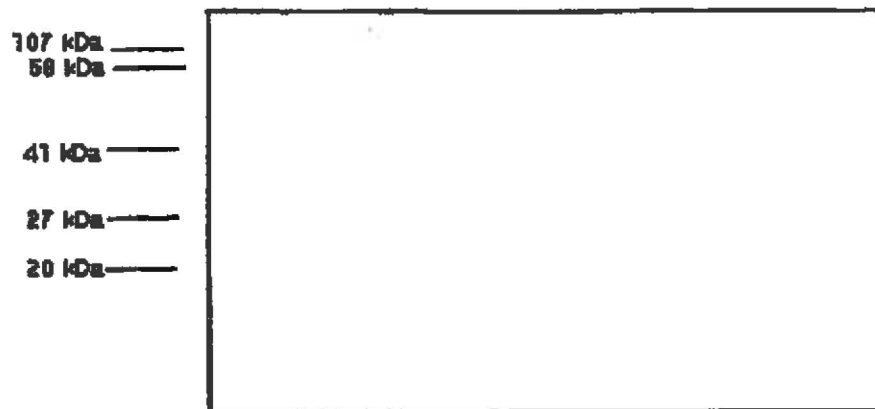


FIG. 2B

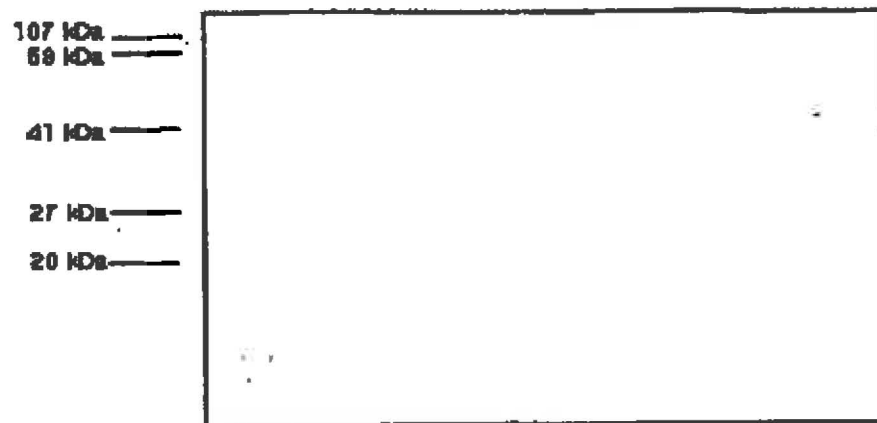


FIG. 2C

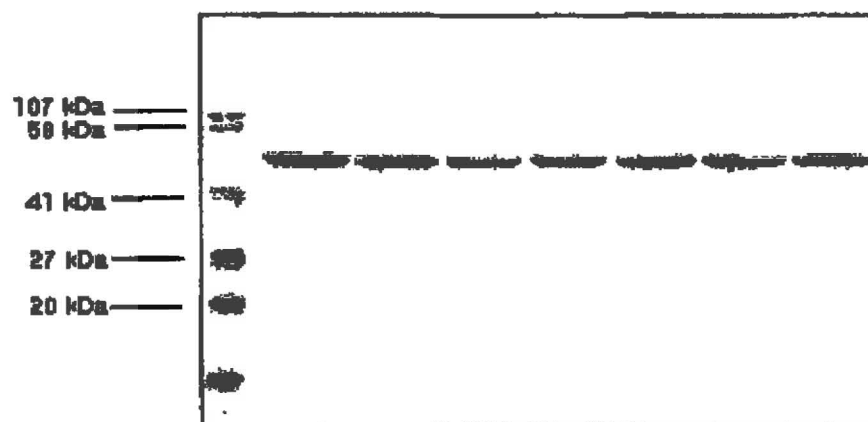


FIG. 3A

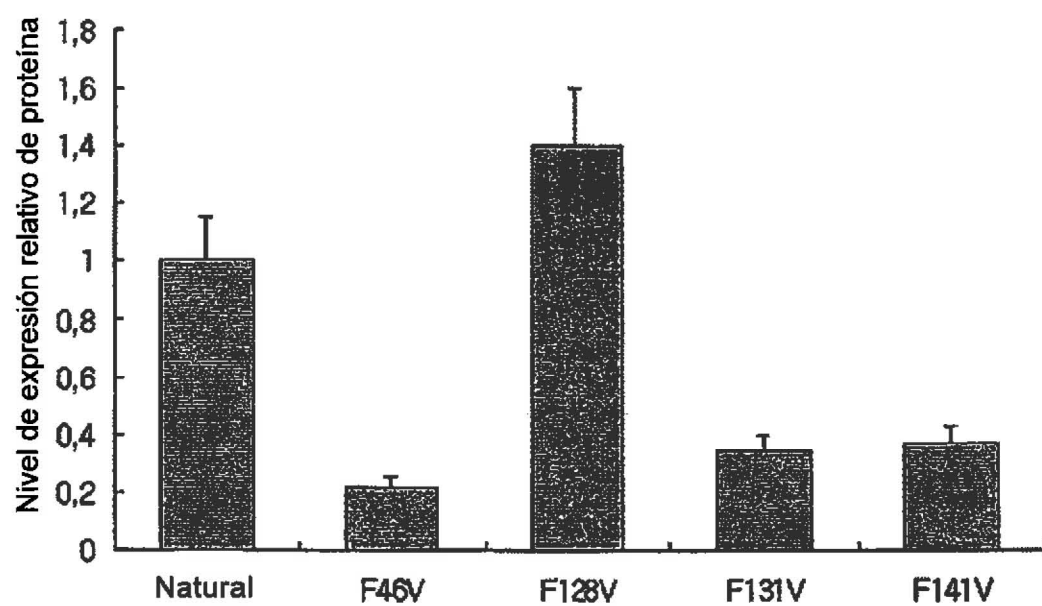


FIG. 3B

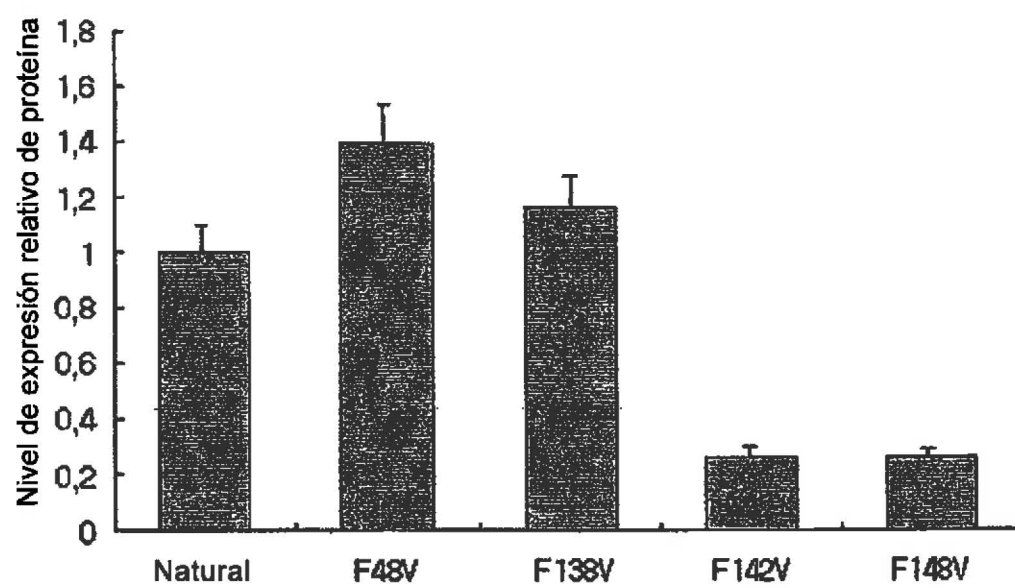


FIG. 3C

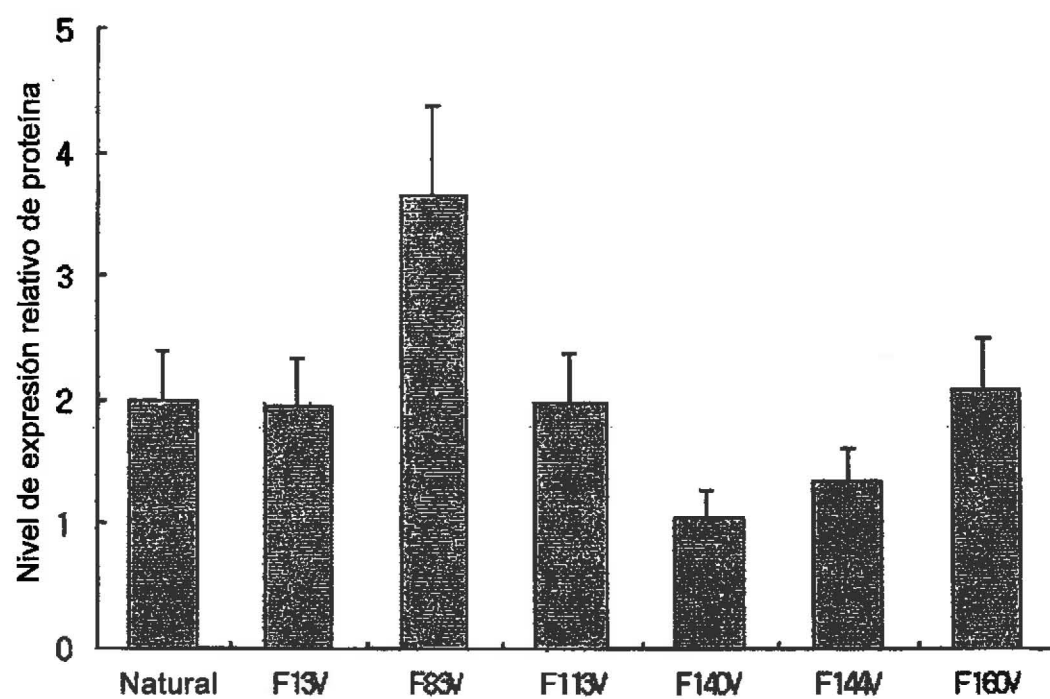


FIG. 4A

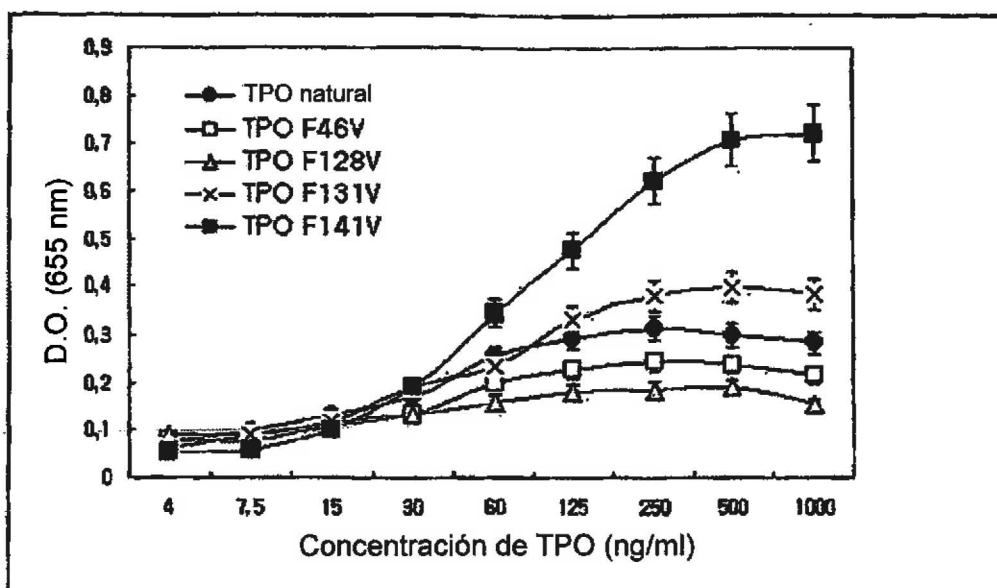


FIG. 4B

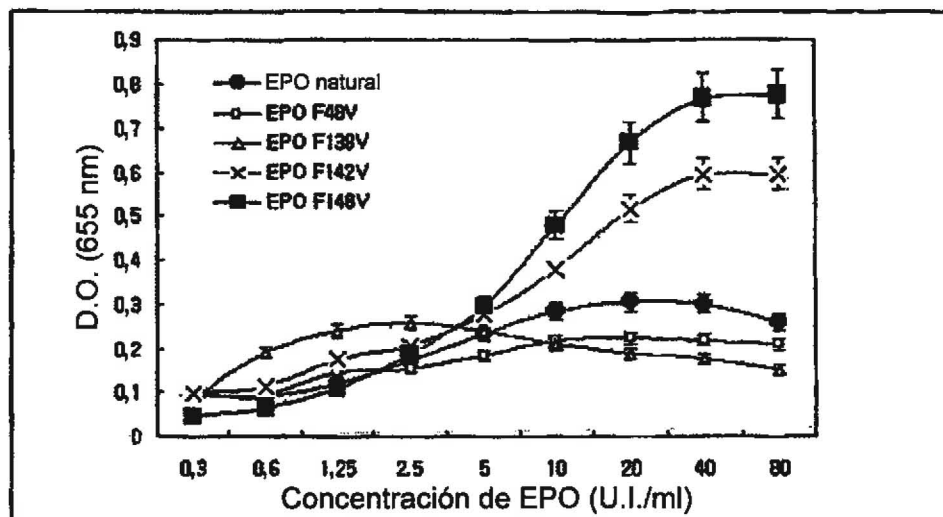


FIG. 4C

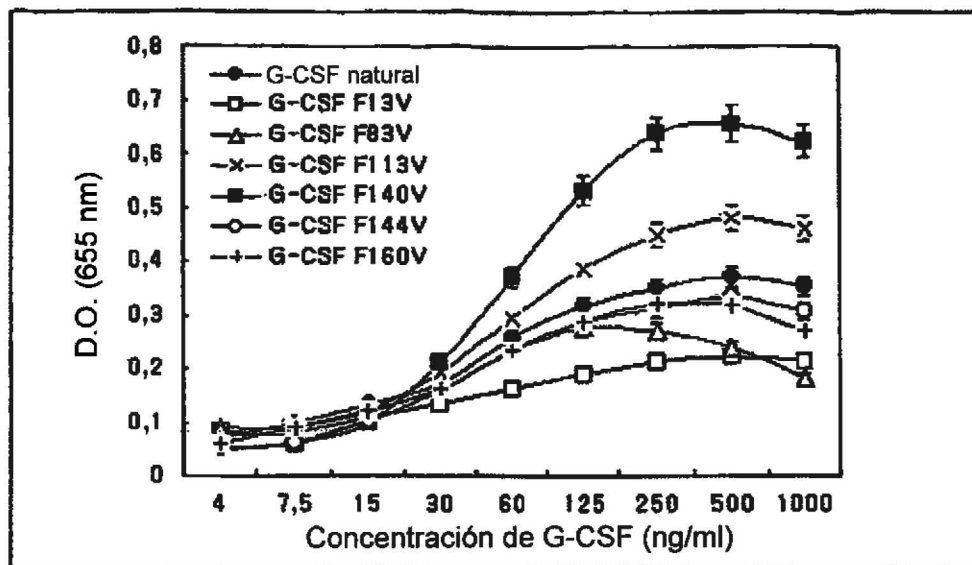


FIG. 4D

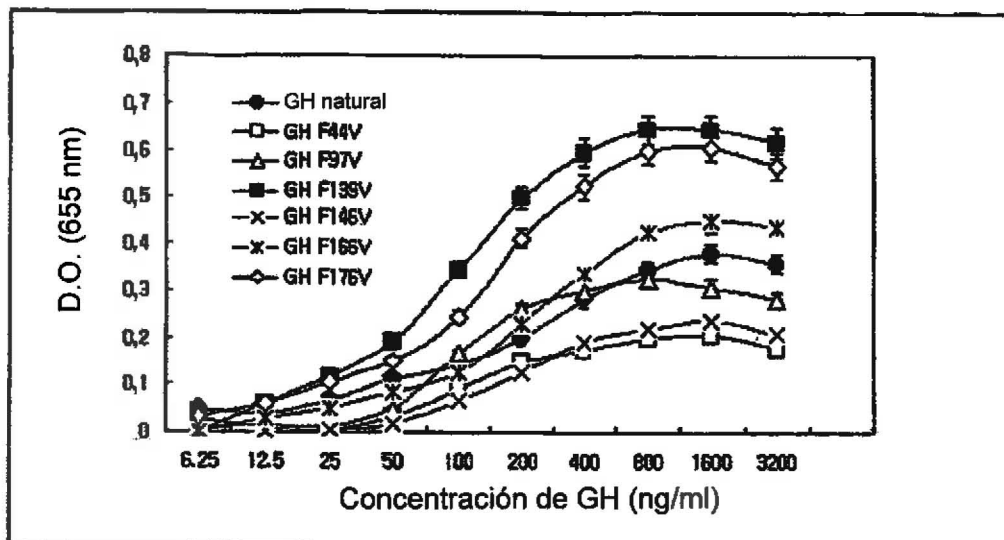


FIG. 5A

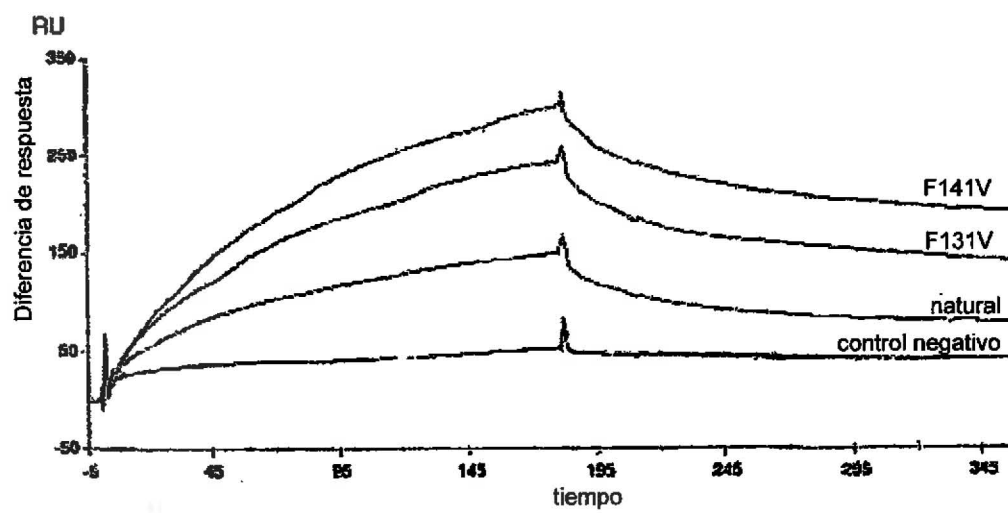


FIG. 5B

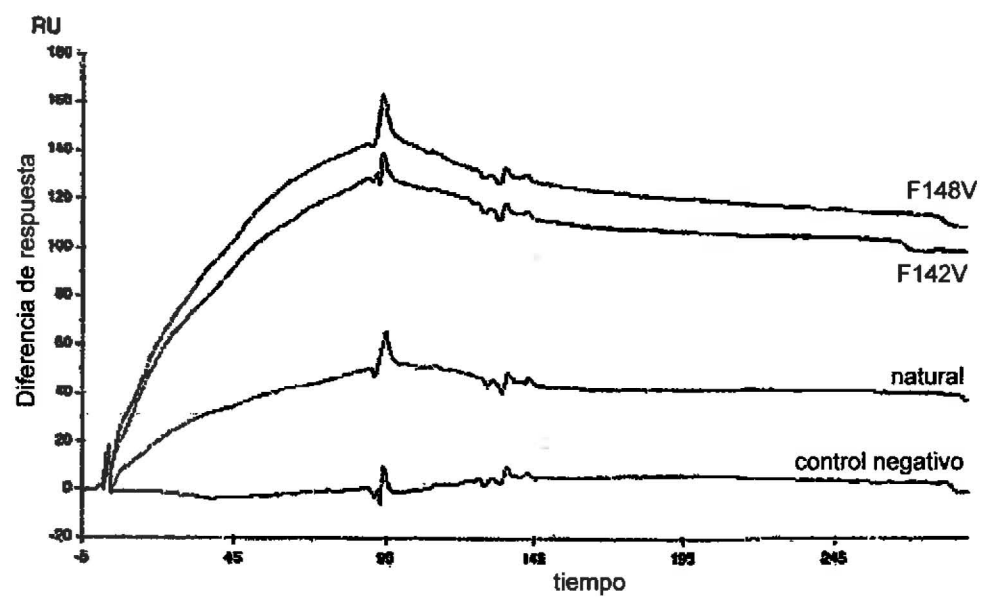


FIG. 6A

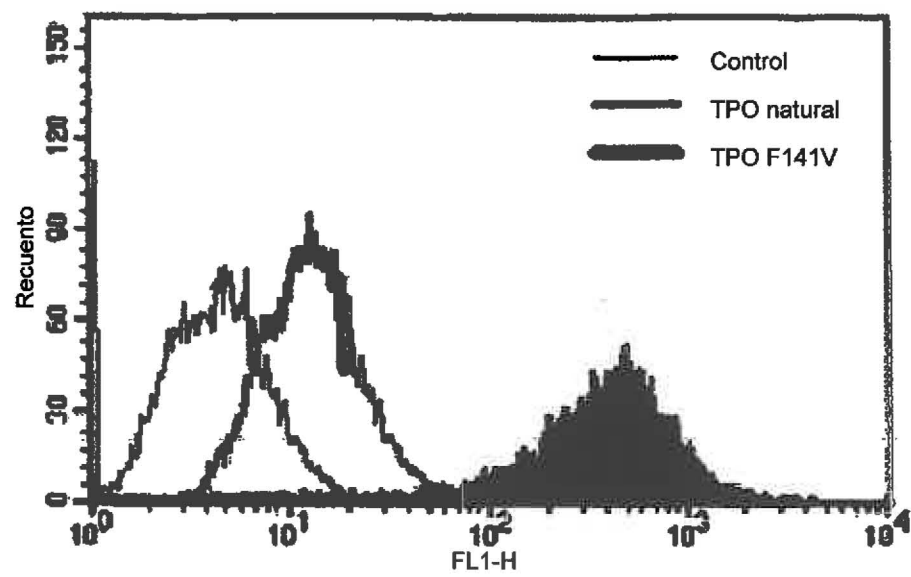


FIG. 6B

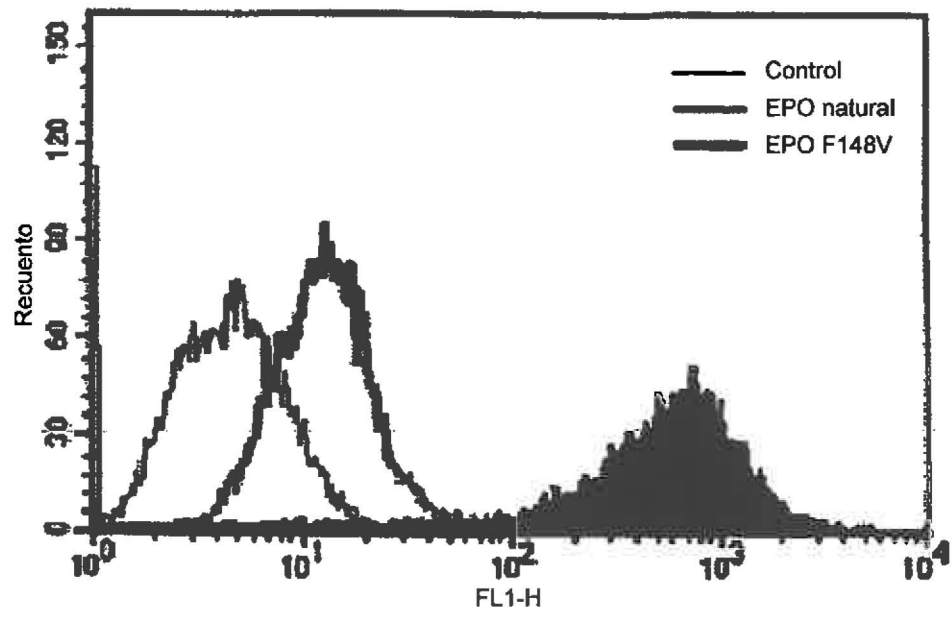


FIG. 7A

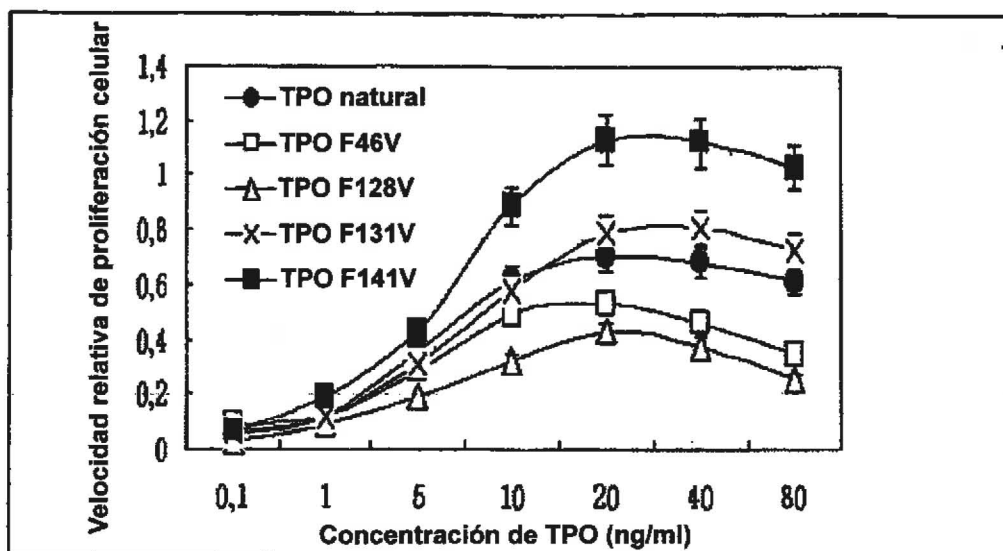


FIG. 7B

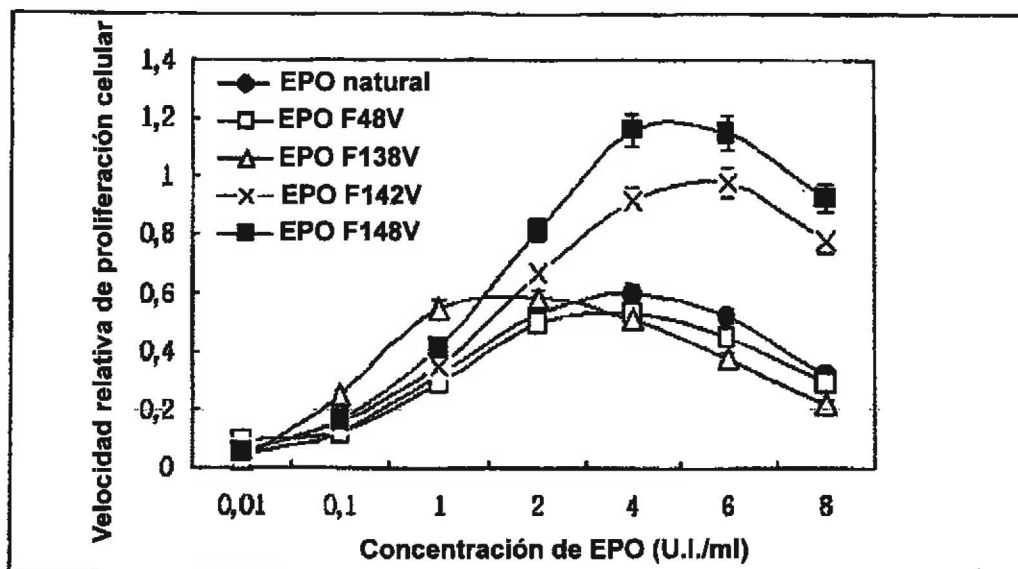


FIG. 7C

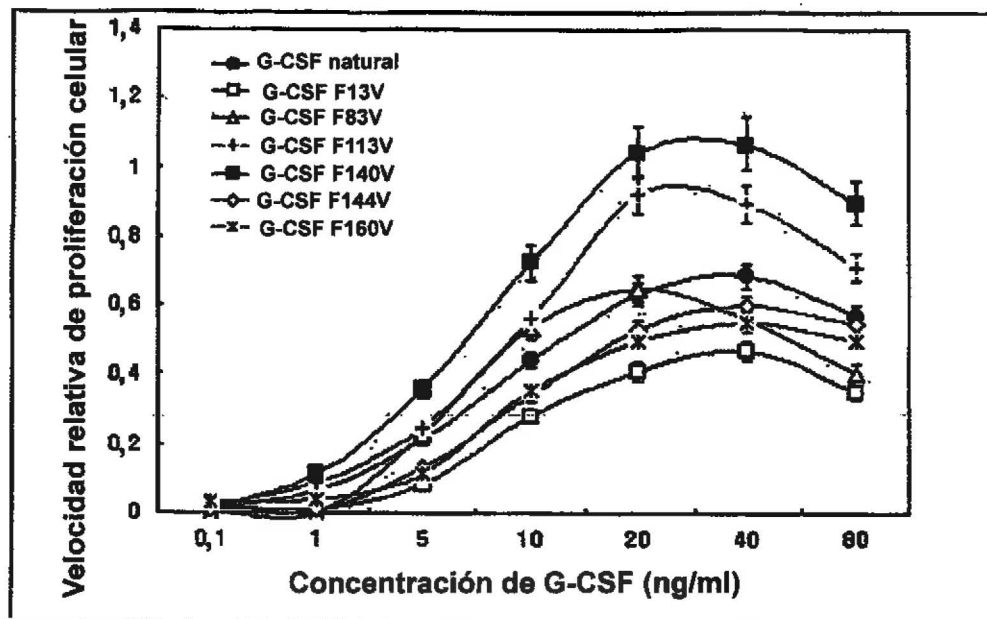


FIG. 7D

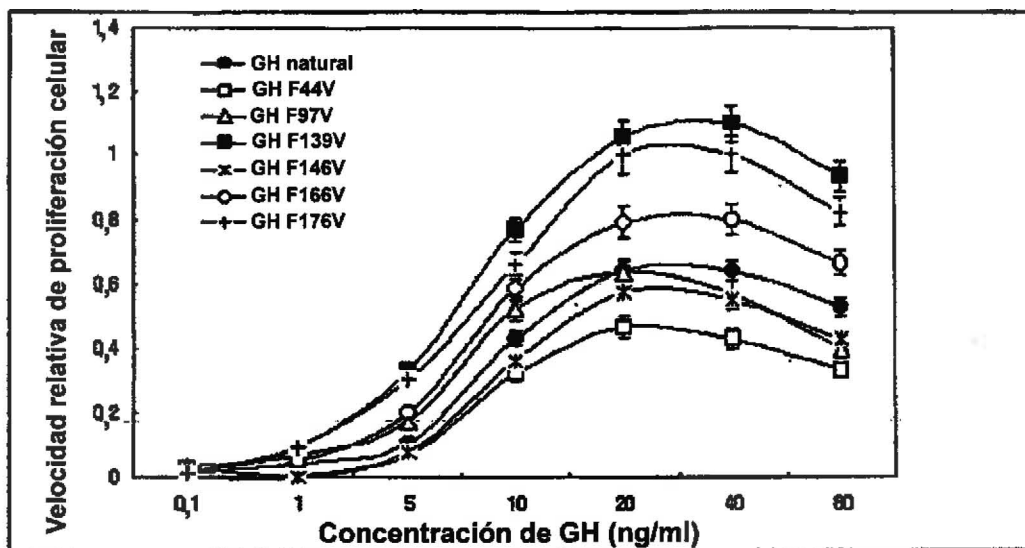


FIG. 8A

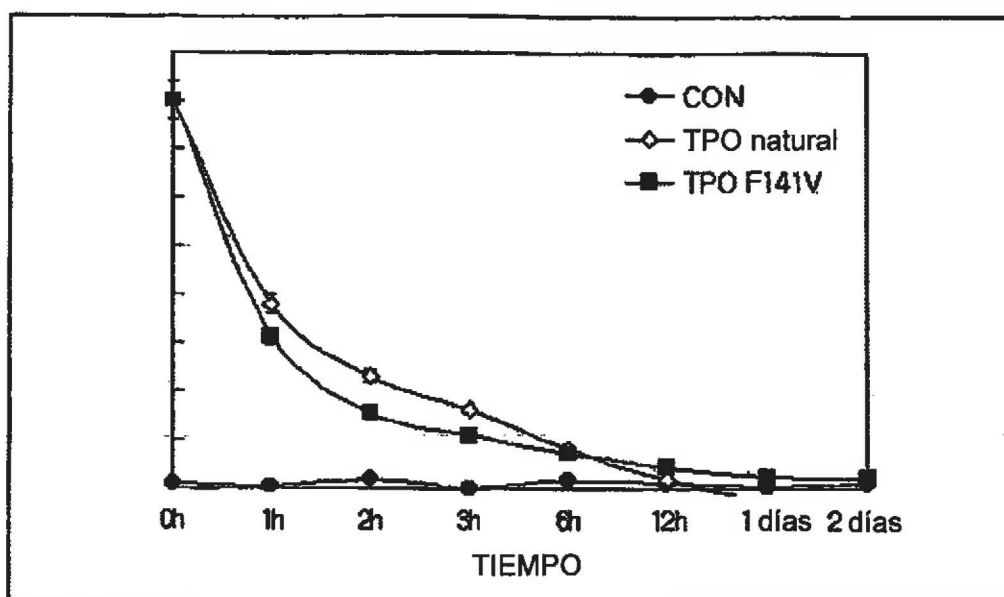


FIG. 8B

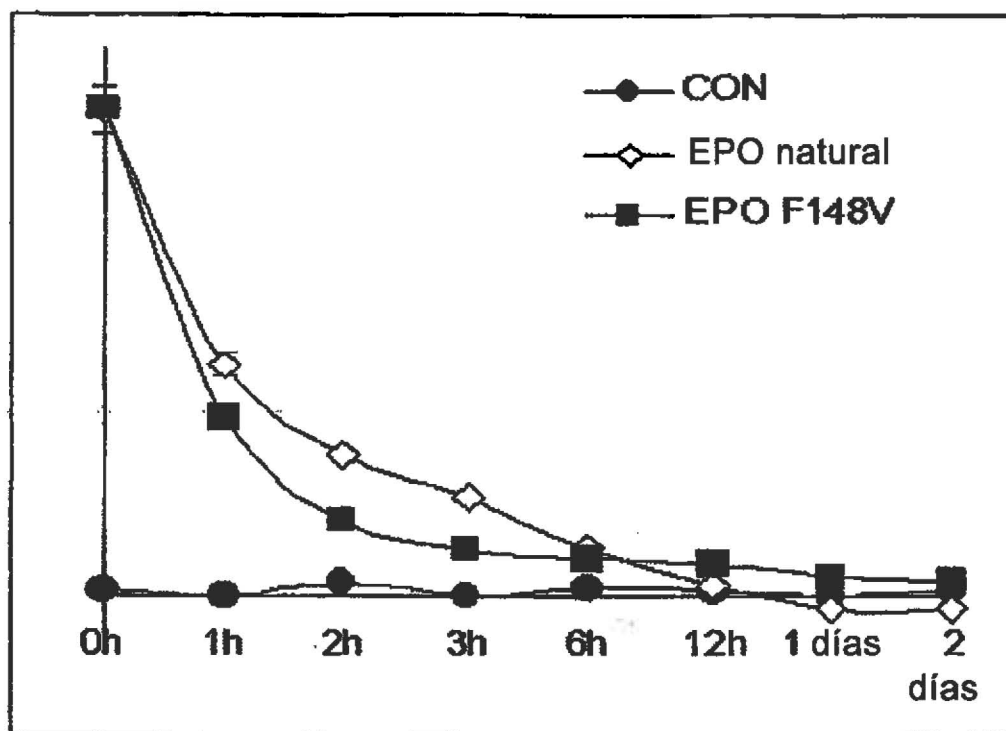


FIG. 8C

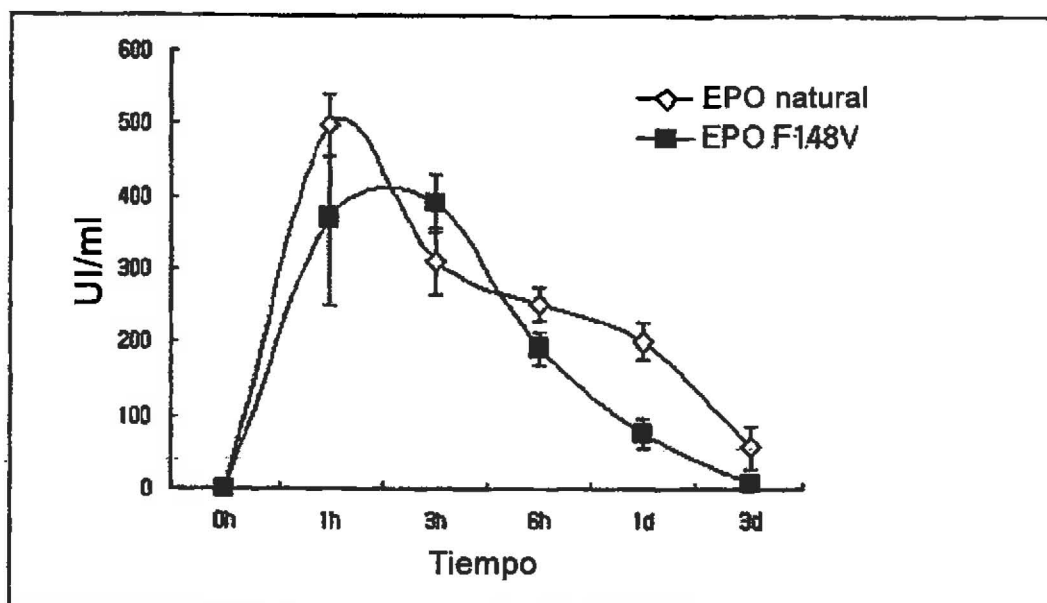


FIG. 9A

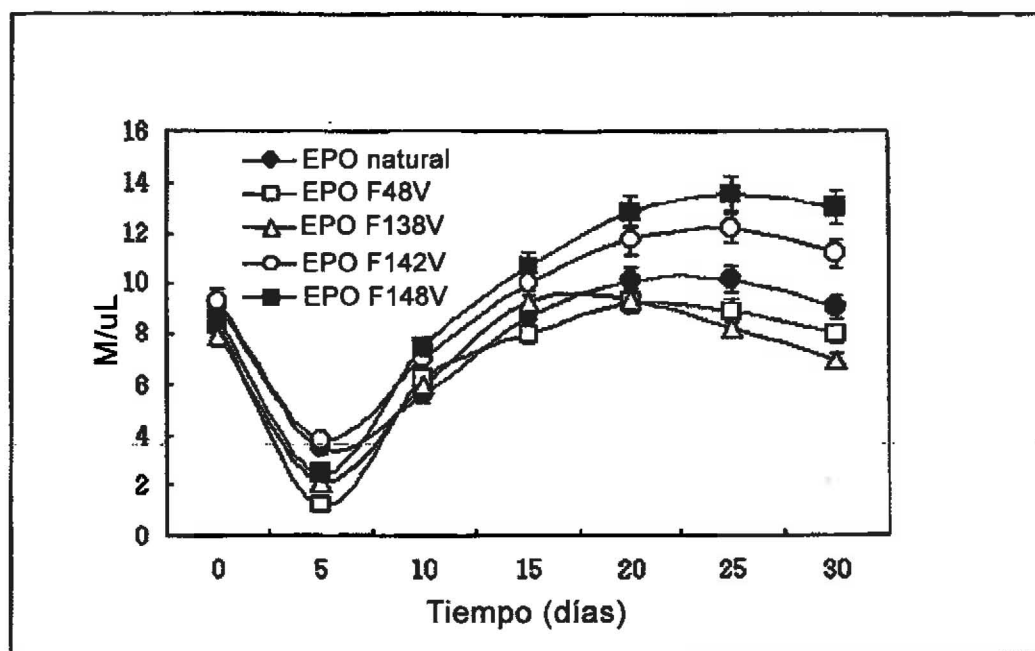


FIG. 9B

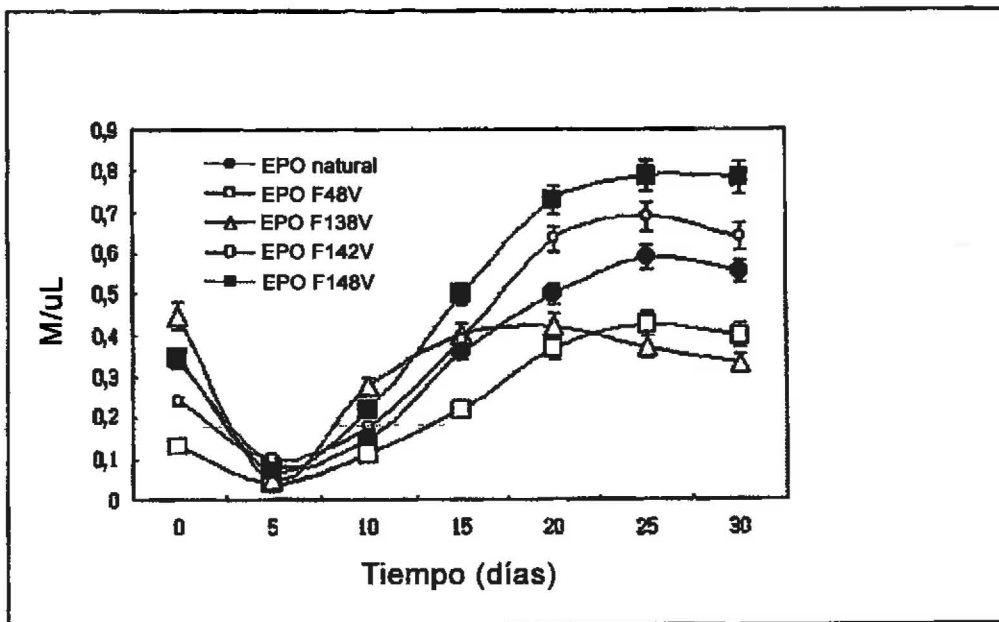


FIG. 9C

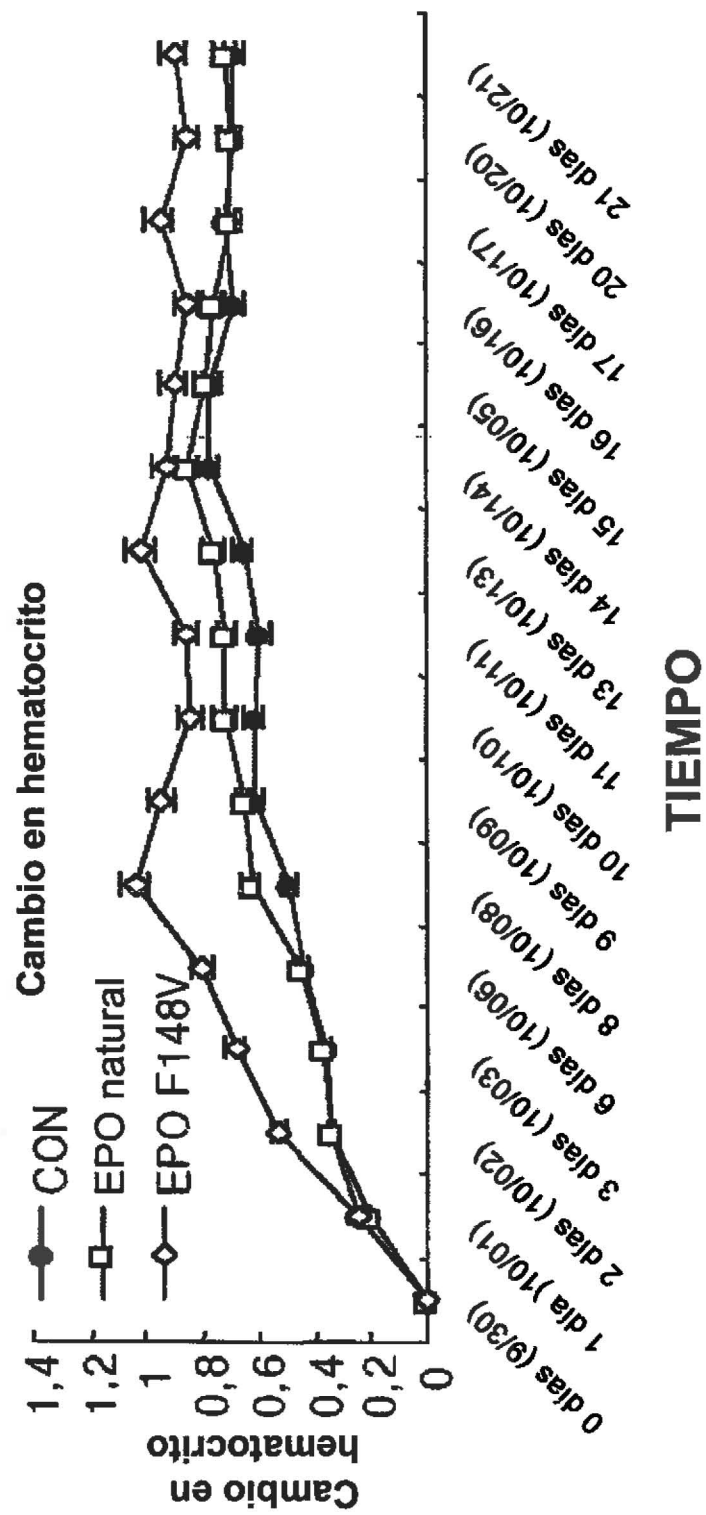


FIG. 10A

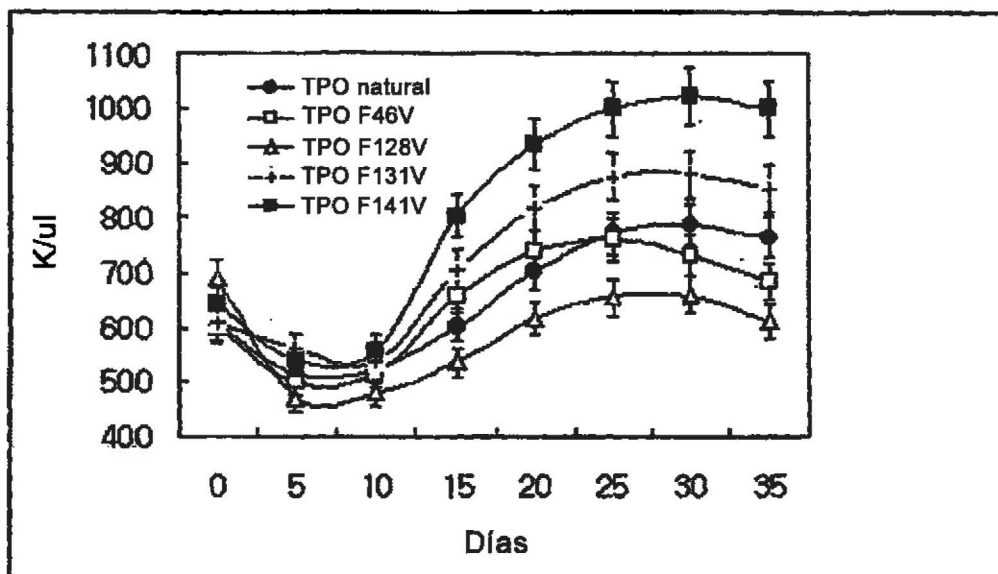


FIG. 10B

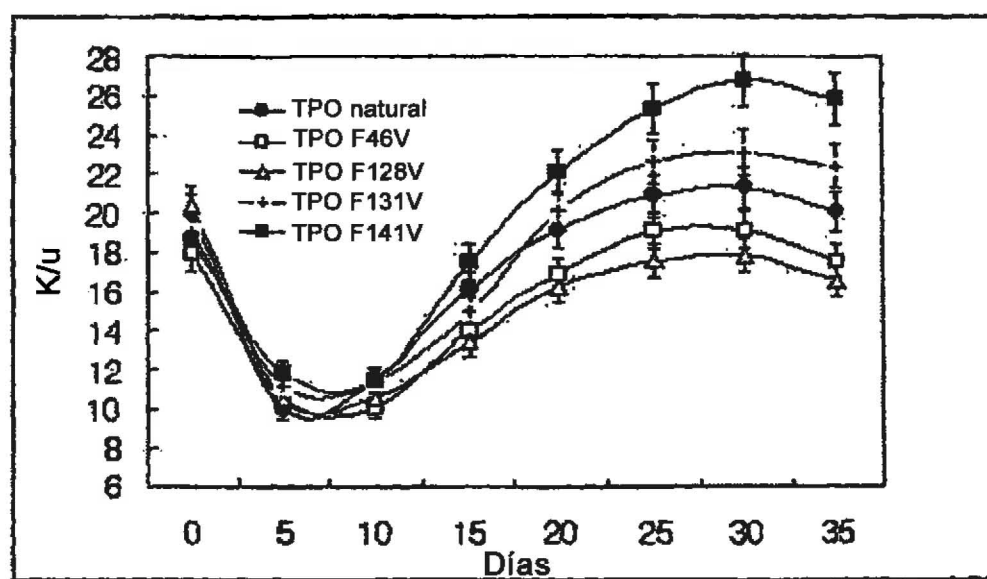


FIG. 10C

