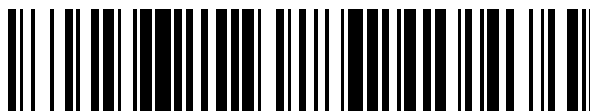


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 093**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/20 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00902412 .6**
96 Fecha de presentación: **14.01.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1144613**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2001**

54 Título: **MÉTODOS PARA PREPARAR PROTEÍNAS QUE CONTIENEN RESTOS DE CISTEÍNA LIBRES.**

30 Prioridad:
14.01.1999 US 116041 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
Bolder Biotechnology, Inc.
2425 55th Street, Suite 210
Boulder, CO 80301, US

72 Inventor/es:
COX, George, N.;
DOHERTY, Daniel, H. y
ROSENDAHL, Mary, S.

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofia**

ES 2 373 093 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para preparar proteínas que contienen restos de cisteína libres.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a un método para preparar proteínas solubles que contienen un resto de cisteína "libre" que no forma un enlace disulfuro.

10 **Antecedentes de la invención**

Existe considerable interés por parte de pacientes y proveedores de asistencia sanitaria en el desarrollo de agentes terapéuticos proteicos "accesibles", de bajo coste y de larga actuación. Las proteínas son caras de fabricar y a diferencia de las moléculas pequeñas farmacológicas convencionales, habitualmente no se absorben fácilmente por el cuerpo. Además se digieren si se toman por vía oral. Por lo tanto, las proteínas deben administrarse típicamente por inyección. Después de la inyección la mayoría de las proteínas se eliminan rápidamente del cuerpo, necesitando inyecciones frecuentes, con frecuencia diarias. A los pacientes no les gustan las inyecciones, lo que conduce a una reducción de la conformidad y reducción de la eficacia farmacológica. Algunas proteínas tales como eritropoyetina (EPO) son eficaces cuando se administran con menos frecuencia (tres veces por semana para EPO) pero esto se debe al hecho de que las proteínas están glucosiladas. La glucosilación requiere que las proteínas recombinantes se fabriquen usando sistemas de expresión de células de mamífero, que es caro y aumenta el coste de los agentes farmacéuticos proteicos.

Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de desarrollar tecnologías de suministro de proteínas que reduzcan los costes de agentes terapéuticos proteicos a pacientes y proveedores de asistencia sanitaria. Una solución a este problema es el desarrollo de métodos para prolongar las semividas en circulación de agentes terapéuticos proteicos en el cuerpo de modo que las proteínas no tengan que inyectarse frecuentemente. Esta solución también satisface las necesidades y deseos de los pacientes de agentes terapéuticos proteicos que sean "accesibles" es decir, agentes terapéuticos proteicos que no requieran inyecciones frecuentes.

La modificación covalente de proteínas con polietilenglicol (PEG) ha demostrado ser un método útil para prolongar las semividas en circulación de proteínas en el cuerpo (Abuchowski *et al.*, 1984; Hershfield, 1987; Meyers *et al.*, 1991). La unión covalente de PEG a una proteína aumenta el tamaño eficaz de la proteína y reduce su tasa de eliminación del cuerpo. Los PEG están disponibles en el mercado en varios tamaños, lo que permite que las semividas en circulación de proteínas modificadas con PEG se adapten a indicaciones individuales a través del uso de PEG de diferentes tamaños. Otros beneficios *in vivo* documentados de modificación con PEG son un aumento de la solubilidad de las proteínas, estabilidad (posiblemente debido a protección de la proteína de proteasas) y una reducción de la inmunogenicidad de las proteínas (Katre *et al.*, 1987; Katre, 1990).

Un método conocido para pegilar proteínas usa compuestos tales como N-hidroxi succinimida (NHS)-PEG para unir PEG a aminas libres, típicamente en restos de lisina o en el aminoácido N-terminal. Una limitación importante de este enfoque es que las proteínas típicamente contienen varias lisinas, además del aminoácido N-terminal, y el resto de PEG se une a la proteína de forma no específica en cualquiera de las aminas libres disponibles, dando como resultado una mezcla de producto heterogénea. Muchas proteínas NHS-pegiladas son inadecuadas para uso comercial debido a bajas actividades específicas y heterogeneidad. Resulta inactivación de la modificación covalente de uno o más restos de lisina o el aminoácido N-terminal requerido para actividad biológica o de unión covalente del resto de PEG cerca del sitio activo de la proteína.

Es de particular relevancia para esta solicitud el hallazgo de que la modificación de hormona de crecimiento humana (hGH) con reactivos sensibles a amina, incluyendo reactivos de NHS-PEG, reduce la actividad biológica de la proteína en más de 10 veces (Teh y Chapman, 1988; Clark *et al.*, 1996). GH es una proteína de 22 kDa secretada por la glándula tiroides. GH estimula el metabolismo de hueso, cartílago y músculo y es la hormona principal del cuerpo para estimular crecimiento somático durante la infancia. Se usa GH humana recombinante (rhGH) para tratar la corta estatura resultante de insuficiencia de GH, síndrome de Turner e insuficiencia renal en niños. GH no está glucosilada y está completamente activa cuando se produce en bacterias. La proteína tiene una semivida *in vivo* corta y debe administrarse por inyección subcutánea diaria para máxima eficacia (MacGillivray *et al.*, 1996).

Existe considerable interés en el desarrollo de formas de larga actuación de hGH. Los intentos de crear formas de larga actuación de hGH por pegilación de la proteína con reactivos de PEG sensibles a amina han conseguido un éxito limitado debido a reducciones significativas de la bioactividad tras la pegilación. Además, la proteína se pegila en múltiples sitios (Clark *et al.*, 1996). hGH contiene nueve lisinas, además del aminoácido N-terminal. Ciertas de estas lisinas se localizan en regiones de la proteína que se sabe que son críticas para la unión del receptor (Cunningham *et al.*, 1989; Cunningham y Wells, 1989). La modificación de estos restos de lisina reduce significativamente la unión del receptor y la bioactividad de la proteína (de la Llosa *et al.*, 1985; Martal *et al.*, 1985; Teh y Chapman, 1988; Cunningham y Wells, 1989). hGH se modifica fácilmente por reactivos NHS-PEG, pero la actividad biológica de la proteína NHS-PEG se ve gravemente afectada, sumando solamente 1 % de la actividad

- biológica de GH de tipo silvestre para una proteína de GH modificada con cinco moléculas de PEG de 5 kDa (Clark *et al.*, 1996). La CE₅₀ para esta proteína de GH pegilada de forma múltiple es 440 ng/ml o aproximadamente 20 nM (Clark *et al.*, 1996). Además de poseer actividad biológica significativamente reducida, NHS-PEG-hGH es muy heterogénea debido a diferentes números de moléculas de PEG unidas a la proteína y en diferentes restos aminoacídicos, lo que tiene un impacto en su utilidad como un agente terapéutico potencial. Clark *et al.* (1996) mostraron que la semivida en circulación de NHS-PEG-hGH en animales se prolonga significativamente en relación con GH no modificada. A pesar de poseer una actividad biológica *in vitro* significativamente reducida, NHS-PEG-hGH fue eficaz y pudo administrarse con menos frecuencia que hGH no modificada en un modelo de rata deficiente en GH (Clark *et al.*, 1996). Sin embargo, se requirieron altas dosis de NHS-PEG-hGH (60-180 µg por inyección por rata) para eficacia en los modelos animales debido a la baja actividad específica de la proteína modificada. Existe una clara necesidad de mejores métodos para crear proteínas de hGH pegiladas que conserven mayor bioactividad. También existe una necesidad de desarrollar métodos para pegilar hGH de modo que se cree un producto de PEG-hGH homogéneo.
- 15 Las actividades biológicas de varias otras proteínas comercialmente importantes se redujeron significativamente por reactivos de PEG sensibles a amina. EPO contiene varios restos de lisina que son críticos para la bioactividad de la proteína (Boissel *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1996) y la modificación de los restos de lisina en EPO da como resultado pérdida casi completa de actividad biológica (Wojchowski y Caslake, 1989). La modificación covalente de interferón alfa 2 con PEG sensibles a amina da como resultado 40-75 % de pérdida de bioactividad (Goodson y Katre, 1990; Karasiewicz *et al.*, 1995). La pérdida de actividad biológica es mayor con PEG grandes (por ejemplo, 10 kDa) (Karasiewicz *et al.*, 1995). La modificación covalente de G-CSF con PEG sensibles a amina da como resultado más del 60 % de pérdida de bioactividad (Tanaka *et al.*, 1991). La modificación extensiva de IL-2 con PEG sensibles a amina da como resultado más del 90 % de pérdida de bioactividad (Goodson y Katre, 1990).
- 25 Un segundo método conocido para pegilar proteínas une covalentemente PEG a restos de cisteína usando PEG sensibles a cisteína. Están disponibles en el mercado varios PEG sensibles a cisteína altamente específicos con diferentes grupos reactivos (por ejemplo, maleimida, vinilsulfona) y PEG de diferentes tamaños (2-40 kDa). A pH neutro, estos reactivos de PEG se unen de forma selectiva a restos de cisteína "libres", es decir restos de cisteína no implicados en enlaces disulfuro. Los restos de cisteína en la mayoría de las proteínas participan en enlaces disulfuro y no están disponibles para pegilación usando PEG sensibles a cisteína. A través de mutagénesis *in vitro* usando técnicas de ADN recombinante, pueden introducirse restos de cisteína adicionales en cualquier lugar dentro de la proteína. Las cisteínas "libres" recién añadidas pueden actuar como sitios para la unión específica de una molécula de PEG usando PEG sensibles a cisteína. El resto de cisteína añadido puede ser una sustitución para un aminoácido existente en una proteína, añadirse antes del extremo amino terminal de la proteína o después del extremo carboxi terminal de la proteína o insertarse entre dos aminoácidos en la proteína. Como alternativa, una de dos cisteínas implicadas en un enlace disulfuro nativo puede suprimirse o sustituirse con otro aminoácido, dejando una cisteína nativa (el resto de cisteína en la proteína que normalmente formaría un enlace disulfuro con el resto de cisteína suprimido o sustituido) libre y disponible para modificación química. Preferiblemente el aminoácido que sustituye a la cisteína sería un aminoácido neutro tal como serina o alanina. La hormona del crecimiento tiene dos enlaces disulfuro que pueden reducirse y alquilarse con yodoacetimida sin perjudicar a la actividad biológica (Bewley *et al.*, (1969). Cada una de las cuatro cisteínas serían dianas razonables para delección o sustitución por otro aminoácido.
- 45 Se conocen varias proteínas de origen natural que contienen uno o más restos de cisteína "libres". Los ejemplos de tales proteínas de origen natural incluyen interleucina humana (IL)-2, interferón beta (Mark *et al.*, 1984), G-CSF (Lu *et al.*, 1989) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (Thompson, 1992). IL-2, G-CSF e interferón beta contienen un número impar de restos de cisteína, mientras que el factor de crecimiento de fibroblastos básicos contiene un número par de restos de cisteína.
- 50 Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes que contienen restos de cisteína libres ha sido problemática debido a la reactividad del sulfhidrilo libre en condiciones fisiológicas. Varias proteínas recombinantes que contienen cisteínas libres se han expresado como proteínas intracelulares en bacterias tales como *E. coli*. Los ejemplos incluyen proteínas naturales tales como IL-2, interferón beta, G-CSF, factor de crecimiento de fibroblastos básico y muteínas de cisteína obtenidas por ingeniería genética de IL-2 (Goodson y Katre, 1990), IL-3 (Shaw *et al.*, 1992), Proteína de Unión a Factor de Necrosis Tumoral (Tuma *et al.*, 1995), IGF-I (Cox y McDermott, 1994), IGFBP-1 (Van Den Berg *et al.*, 1997) y proteasa nexina y proteínas relacionadas (Braxton, 1998). Todas estas proteínas fueron insolubles cuando se expresaron de forma intracelular en bacterias. Las proteínas insolubles podían replegarse a sus conformaciones nativas realizando una serie de procedimientos de desnaturalización, reducción y replegamiento. Estas etapas añaden tiempo y coste al proceso de fabricación para producir las proteínas en bacterias. Se ha obtenido mejora de la estabilidad y rendimientos de IL-2 (Mark *et al.*, 1985) e interferón beta (DeChiara *et al.*, 1986) sustituyendo con otro aminoácido, por ejemplo, serina, el resto de cisteína libre. Sería preferible expresar las proteínas recombinantes en una forma soluble biológicamente activa para eliminar estas etapas extra.
- 65 Un método conocido para expresar proteínas recombinantes solubles en bacterias es secretarlas al espacio periplásmico o al medio. Se sabe que ciertas proteínas recombinantes tales como GH se expresan en una forma

activa soluble cuando se secretan al periplasma de *E. coli*, mientras que son insolubles cuando se expresan de forma intracelular en *E. coli*. La secreción se consigue fusionando secuencias de ADN que codifican la hormona del crecimiento u otras proteínas de interés con secuencias de ADN que codifican secuencias de señal bacterianas tales como las derivadas de las proteínas stII (Fujimoto *et al.*, 1988) y ompA (Ghrayeb *et al.*, 1984). La secreción de proteínas recombinantes en bacterias es deseable porque el extremo N-terminal natural de la proteína recombinante puede mantenerse. La expresión intracelular de proteínas recombinantes requiere que una metionina N-terminal esté presente en el extremo amino-terminal de la proteína recombinante. La metionina no está presente normalmente en el extremo amino-terminal de las formas maduras de muchas proteínas humanas. Por ejemplo, el aminoácido amino-terminal de la forma madura de la hormona de crecimiento humana es fenilalanina. Debe añadirse metionina amino-terminal al extremo amino-terminal de una proteína recombinante, si no está presente una metionina en esta posición, para que la proteína se exprese eficazmente en las bacterias. Típicamente se consigue adición de la metionina amino-terminal añadiendo un codón de metionina ATG antes de la secuencia de ADN que codifica la proteína recombinante. La metionina N-terminal añadida con frecuencia no se retira de la proteína recombinante, particularmente si la proteína recombinante es insoluble. Tal es el caso con hGH, en la que la metionina N-terminal no se retira cuando la proteína se expresa de forma intracelular en *E. coli*. La metionina N-terminal añadida crea una proteína "no natural" que puede estimular potencialmente una respuesta inmune en un ser humano. Por el contrario, no hay metionina añadida en hGH que se secreta al espacio periplásmico usando secuencias señal de stII (Chang *et al.*, 1987) u ompA (Cheah *et al.*, 1994); la proteína recombinante comienza con el aminoácido nativo amino-terminal fenilalanina. La secuencia de proteína hGH nativa se mantiene debido a enzimas bacterianas que escinden la proteína stII-hGH (o proteína omp-A-hGH= entre la secuencia señal stII (u ompA) y el comienzo de la proteína de hGH madura. Aunque se cree que el espacio periplásmico es un ambiente oxidante que debería promover la formación de enlace disulfuro, la co-expresión de proteína disulfuro isomerasa con inhibidor de tripsina pancreática bovina dio como resultado un aumento de seis veces en la producción de proteína correctamente plegada del periplasma de *E. coli* (Ostermeier *et al.*, (1996). Este resultado sugeriría que el plegamiento de la proteína periplásmica puede en ocasiones ser ineficaz y necesita mejora para producción de proteína a gran escala.

hGH tiene cuatro cisteínas que forman dos disulfuros. hGH puede secretarse en el periplasma de *E. coli* usando secuencias señal de stII u ompA. La proteína secretada es soluble y biológicamente activa (Hsiung *et al.*, 1986). La forma secretada predominante de hGH es un monómero con un peso molecular aparente por electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de 22 kDa. Puede aislarse hGH recombinante del espacio periplásmico usando un procedimiento de choque osmótico (Koshland y Botstein, 1980), que libera preferentemente proteínas periplásmicas, pero no intracelulares, en el tampón de choque osmótico. La proteína de hGH liberada se purifica después por cromatografía de columna (Hsiung *et al.*, 1986).

Quando se intentaron procedimientos similares para secretar variantes de hGH que contenían un resto de cisteína libre (cinco cisteínas; 2N +1) se descubrió que las variantes de hGH recombinantes formaban multímeros y agregados cuando se aislaban usando procedimientos de choque osmótico y purificación convencionales desarrollados para hGH. Pudieron detectarse muy pocas de las proteínas variantes de hGH monoméricas por SDS-PAGE no reducido en los lisados de choque osmótico o durante la purificación de las proteínas por cromatografía de columna.

El interferón alfa (IFN- α 2) también contiene cuatro restos de cisteína que forman dos enlaces disulfuro. IFN- α 2 puede secretarse en el periplasma de *E. coli* usando la secuencia señal de stII (Voss *et al.*, 1994). La proteína secretada es soluble y biológicamente activa (Voss *et al.*, 1994). La forma secretada predominante de IFN- α 2 es un monómero con un peso molecular aparente por SDS-PAGE de 19 kDa. Puede purificarse IFN- α 2 recombinante secretado por cromatografía de columna (Voss *et al.*, 1994).

Quando se intentaron procedimientos similares para secretar variantes de IFN- α 2 que contenían un resto de cisteína libre (cinco cisteínas; 2N+1), se descubrió que las variantes de IFN- α 2 recombinantes formaban multímeros y agregados cuando se aislaban usando procedimientos de purificación convencionales desarrollados para IFN- α 2. Las variantes de IFN- α 2 se eluyeron de las columnas de forma muy diferente a IFN- α 2 y se pudo purificar muy poco de las proteínas variantes de IFN- α 2 monoméricas usando procedimientos de cromatografía de columna desarrollados para IFN- α 2.

Un método alternativo para sintetizar una proteína que contiene un resto de cisteína libre es introducir un grupo tiol en una proteína de forma post-traducciona mediante una reacción química con succinimidil 6-[3-2-piridilditio]propionamido]hexanoato (LC-SPDP, disponible en el mercado de Pierce Chemical Company). LC-SPDP reacciona con los restos de lisina para crear un grupo sulfhidrilo libre. Se preparó EPO dimérica reticulada químicamente usando este reactivo junto con un reactivo modificador de proteína de maleimida (Sytkowsk *et al.*, 1998). Se recuperó una mezcla heteróloga de proteínas EPO reticuladas químicamente después de purificación debido a modificación no específica de los diversos restos de lisina en EPO. Se observó farmacocinética y potencia *in vivo* mejoradas de las proteínas EPO reticuladas químicamente.

Otro método que se ha usado para aumentar el tamaño de una proteína y mejorar su potencia *in vivo* implica la

dimerización de la proteína usando reactivos reticulantes químicos. Se cree que GH transduce una señal celular por reticulación de dos receptores de GH. Un dímero GH-GH podría facilitar la dimerización de receptor potenciada y posterior amplificación de la señal intracelular.

- 5 Se han descrito proteínas de hGH diméricas reticuladas químicamente por Mockridge *et al.* (1998). Usando un reactivo de reticulación soluble en agua 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), GH se derivó de forma aleatoria para proporcionar predominantemente dímeros ligados a amina pero también multímeros ligados a amina, dependiendo de la concentración del reactivo EDC usado. Aunque se observó un aumento de la potencia *in vivo*, la preparación de proteína final fue heterogénea debido a reacción no específica del reactivo EDC con diversos aminoácidos en la proteína incluyendo restos de lisina, ácido aspártico y ácido glutámico y los extremos amino y carboxi terminales. La inyección de dicha preparación en seres humanos no sería deseable debido a la naturaleza tóxica de EDC, potencial respuesta inmunogénica al enlace de amida no natural formado entre las proteínas. También sería difícil generar lotes consistentes de una proteína purificada a la escala de fabricación.
- 10
- 15 Por lo tanto, a pesar de un esfuerzo considerable, aún existe la necesidad de un proceso para generar preparaciones homogéneas de proteínas recombinantes de larga actuación por mejora del peso molecular de las proteínas. También la necesidad de métodos que permitan secreción y recuperación de proteínas recombinantes que contengan restos de cisteína libres en alto rendimiento. La presente invención satisface estas necesidades y también proporciona ventajas relacionadas.
- 20

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para obtener una proteína soluble que tenga una cisteína libre. Los métodos se consiguen generalmente obteniendo una célula hospedadora capaz de expresar la proteína soluble, exponiendo la célula hospedadora a un agente de bloqueo de cisteína y aislando la proteína soluble de la célula hospedadora. En una realización en la que la proteína no se secreta al medio por la célula hospedadora, la célula hospedadora se rompe en presencia del agente de bloqueo de cisteína y la proteína soluble se aísla o purifica de la fracción soluble de la célula hospedadora rota. En otra realización en la que se secreta la proteína soluble por la célula hospedadora al medio, la célula hospedadora se expone al agente de bloqueo de cisteína antes, durante, o después de síntesis de la proteína soluble por la célula hospedadora.

25

30

Las células hospedadoras adecuadas incluyen células de bacterias, levadura, insecto o mamífero. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula bacteriana, particularmente *E. coli*.

35 Preferiblemente, la proteína soluble producida por los métodos de la presente invención son proteínas recombinantes, especialmente variantes de cisteína o muteínas de una proteína. Los métodos son útiles para producir proteínas incluyendo, sin limitación, hormona del crecimiento humana, EPO e interferón, especialmente interferón alfa, sus derivados o antagonistas. Otras proteínas incluyen miembros de la superfamilia de TGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas A, factor de crecimiento derivado de plaquetas B, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado de cerebro, neurotrofina 3, neurotrofina 4, factor de crecimiento endotelial vascular o un derivado o un antagonista de los mismos. Las muteínas de cisteína de cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina o un derivado de la misma también se contemplan.

40

Los agentes de bloqueo de cisteína útiles incluyen cualquier compuesto sensible a tior, incluyendo por ejemplo, cistina, cistamina, ácido ditioglicólico, glutatión oxidado.

45

Los presentes métodos incluyen además diversos métodos para unir un resto de PEG a la proteína soluble para formar proteínas pegiladas en las que el resto de PEG se une a la proteína soluble a través de la cisteína libre.

50 La presente invención incluye adicionalmente las proteínas solubles y sus derivados, incluyendo proteínas pegiladas, compuestas por los métodos descritos en este documento. Tales proteínas pegiladas incluyen hGh monopegilada, EPO e interferón alfa.

La presente invención también proporciona métodos para pegilar las proteínas solubles obtenidas por los métodos descritos en este documento. Tales métodos incluyen purificar la proteína, reducir al menos parcialmente la proteína con un agente reductor de disulfuro y exponer la proteína a un resto sensible a cisteína. Opcionalmente, la proteína de cisteína modificada puede aislarse a partir de proteína no modificada.

55

El uso de variantes de cisteína de hormona del crecimiento, EPO o interferón alfa para la preparación de un medicamento para tratar una afección tratable con hormona de crecimiento, EPO o interferón alfa también están dentro de la presente invención.

60

Breve descripción de la Figura

65 La Figura 1 es un diagrama de mutagénesis por extensión de solapamiento en la que se amplifican dos fragmentos separados de un segmento de ADN diana.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona nuevos métodos para obtener proteínas que tengan restos de cisteína libres. La invención proporciona adicionalmente nuevas proteínas, particularmente proteínas recombinantes, producidas por estos nuevos métodos así como derivados de tales proteínas recombinantes. Los nuevos métodos para preparar tales proteínas se consiguen generalmente:

a) obteniendo una célula hospedadora capaz de expresar la proteína soluble, en la que la proteína soluble contiene al menos una cisteína libre añadida;

b) exponiendo la célula hospedadora a un agente de bloqueo de cisteína antes de la etapa (c), formando dicho agente de bloqueo de cisteína un disulfuro mezclado, reversible, estable con al menos un resto de cisteína en dicha proteína soluble; y

c) aislando la proteína soluble de las células hospedadoras, conteniendo dicha proteína soluble al menos una cisteína libre,

siendo el agente de bloqueo de cisteína un compuesto sensible a tiol seleccionado del grupo que consiste en cistina o un derivado de la misma, cistamina o un derivado de la misma, ácido ditioglicólico o un derivado del mismo y un glutatión oxidado o un derivado del mismo.

En una realización, los métodos incluyen las etapas de romper la célula hospedadora en presencia del agente de bloqueo de cisteína, seguido de aislar la proteína de la fracción soluble de la célula rota.

En una realización adicional en la que las proteínas se secretan al medio por células hospedadoras procariotas o eucariotas, los métodos incluyen las etapas de:

a) obtener una célula hospedadora capaz de expresar una proteína que tenga una cisteína libre

b) exponer la célula hospedadora a un agente de bloqueo de cisteína durante la síntesis o después de la síntesis pero antes de la purificación de la proteína que tenga un resto de cisteína libre; y

d) aislar la proteína de otros componentes celulares en el medio.

Como se ha identificado anteriormente, la primera etapa en estos métodos es obtener una célula hospedadora capaz de expresar una proteína que tenga un resto de cisteína libre. Las células hospedadoras adecuadas pueden ser procariotas o eucariotas. Los ejemplos de células hospedadoras apropiadas que pueden usarse para expresar proteínas recombinantes incluyen células bacterianas, de levadura, de insecto y de mamífero. Las células bacterianas son particularmente útiles, especialmente *E. coli*.

Como se usa en el presente documento la expresión "la proteína que tiene un resto de cisteína libre" significa cualquier péptido proteico natural o recombinante que contenga 2N+1 restos de cisteína, pudiendo ser N 0 o cualquier número entero y proteínas o péptidos que contengan 2N cisteínas, en los que dos o más de las cisteínas no participan normalmente en un enlace disulfuro. Por lo tanto, los métodos de la presente invención son útiles en la potenciación de la expresión, recuperación y purificación de cualquier proteína o péptido que tenga una cisteína libre, particularmente proteínas recombinantes variantes con cisteína añadida (denominadas en este documento "mutéínas de cisteína" o "variantes de cisteína") que tengan una o más cisteínas libres y/o que tengan dos o más cisteínas que forman de forma natural un enlace disulfuro. Aunque la expresión, recuperación y purificación de una proteína natural que tenga una cisteína libre expresada por su célula hospedadora natural puede potenciarse por los métodos de la presente invención, la descripción en el presente documento se refiere predominantemente a proteínas recombinantes para fines ilustrativos solamente. Además, las proteínas pueden derivarse de cualquier especie animal incluyendo seres humanos, animales de compañía y animales de granja.

En consecuencia, la presente invención abarca una amplia diversidad de proteínas recombinantes. Estas proteínas incluyen, pero sin limitación, factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), factor de crecimiento transformante betal (TGF-beta1), TGF-beta2, TGF-beta3, inhibina A, inhibina B, proteína morfogenética del hueso 2 (BMP-2), BMP-4, inhibina alfa, sustancia inhibidora mulleriana (MIS), OP-1 (proteína osteogénica 1), que son todos miembros de la superfamilia de TGF-beta. Las subunidades monoméricas de la superfamilia de TGF-beta comparten ciertas características estructurales: contienen generalmente 8 restos de cisteína altamente conservados que forman 4 disulfuros intramoleculares. Típicamente una novena cisteína conservada es libre en la forma monomérica de la proteína pero participa en un enlace disulfuro intermolecular formado durante la homodimerización o heterodimerización de las subunidades monoméricas. Otros miembros de la superfamilia TGF-beta se describen por Massague (1990), Daopin *et al.* (1992), Kingsley (1994), Kutty *et al.* (1998) y Lawton *et al.* (1997).

Los monómeros de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina también contienen restos de cisteína que participan en disulfuros intramoleculares así como cisteínas libres (Roitt *et al.*, 1989 y Paul, 1989). Estas cisteínas libres

normalmente solo participan en enlaces disulfuro como consecuencia de acontecimientos de multimerización tales como homodimerización de cadena pesada, heterodimerización de cadena pesada-cadena ligera, homodimerización de los heterodímeros (cadena pesada-cadena ligera) y otros conjuntos de órdenes superiores tales como pentamerización de los heterodímeros (cadena pesada-cadena ligera) en el caso de IgM. Por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden emplearse para potenciar la expresión, recuperación y purificación de cadenas pesadas y/o ligeras (o diversos dominios de las mismas) de inmunoglobulinas humanas tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Las inmunoglobulinas de otras especies podrían también expresarse, recuperarse y purificarse de forma similar. Podrían expresarse, recuperarse y purificarse de forma similar proteínas genéticamente fusionadas con inmunoglobulinas o dominios de inmunoglobulinas como se describen en Chamow & Ashkenazi (1996).

Los presentes métodos también pueden potenciar la expresión, recuperación y purificación de proteínas recombinantes adicionales incluyendo miembros de la superfamilia de la hormona del crecimiento. Las siguientes proteínas se codifican por genes de la familia del supergen de hormona de crecimiento (GH) (Bazan (1990); Bazan (1991); Mott y Campbell (1995); Silvennoinen y Ihle (1996); Martin *et al.*, 1990; Hannum *et al.*, 1994): hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), interleucina-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (subunidad p35), IL-13, IL-15, oncostatina M, factor neurotrófico ciliar, factor inhibidor de leucemia, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), cardiotrofina-1 (CT-1), Factor de Células Madre y el ligando flt3/flk2 ("la familia del supergen de GH"). Se anticipa que se identificarán miembros adicionales de esta familia génica en el futuro a través de clonación y secuenciación de genes. Los miembros de la familia del supergen GH tienen estructuras secundarias y terciarias similares, a pesar del hecho de que generalmente tienen identidad de secuencia de ADN o de aminoácidos limitada. Las características estructurales compartidas permiten identificar fácilmente nuevos miembros de la familia génica.

Se ha clasificado un grupo de proteínas como una superfamilia estructural basándose en el motivo estructural compartido denominado el "nudo de cistina". El nudo de cistina se define por seis restos de cisteína conservados que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares que se "anudan" topológicamente (McDonald y Hendrickson, 1993). Estas proteínas también forman homo o heterodímeros y en algunos pero no en todos los casos la dimerización implica formación de disulfuro intermolecular. Miembros de esta familia incluyen los miembros de la superfamilia de TGF-beta y otras proteínas tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGF-A), PDGF-B, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), NT-4 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La cistina y otros reactivos de bloqueo de cisteína también podrían potenciar la expresión, recuperación y purificación de proteínas con este motivo estructural.

Los presentes métodos también pueden potenciar la expresión, recuperación y purificación de otras proteínas recombinantes y/o variantes con cisteína añadida de esas proteínas. Las clases de proteínas incluirían proteasas y otras enzimas, inhibidores de proteasa, citocinas, antagonistas de citocina, alérgenos, quimiocinas, gonadotropinas, quimiotactinas, proteínas de unión a lípidos, hormonas tiroideas, factores de crecimiento, somatomedinas, inmunoglobulinas, interleucinas, interferones, receptores solubles, vacunas y hemoglobinas. Los ejemplos específicos de proteínas incluyen, por ejemplo, leptina, insulina, factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1), superóxido dismutasa, catalasa, asparaginasa, uricasa, factores de crecimiento de fibroblastos, arginasa, fenilalanina amonio, angiostatina, endostatina, Factor VIII, Factor IX, antagonista del receptor de interleucina 1, proteasa nexina y antitrombina III.

Otras variantes de proteína que se beneficiarían de la pegilación y serían por lo tanto candidatos razonables para modificaciones de cisteína añadida incluyen proteínas o péptidos con baja solubilidad o una tendencia a agregarse, proteínas o péptidos que son susceptibles de proteólisis, proteínas o péptidos que necesiten estabilidad mecánica mejorada, proteínas o péptidos que se eliminen rápidamente del cuerpo o proteínas o péptidos con propiedades inmunogénicas o antigénicas indeseables.

Si se desea, las muteínas de proteínas naturales pueden construirse generalmente usando mutagénesis basada en PCR dirigida como se describe en general en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications editado por White, B. A. (1993) Humana Press, Inc., Totowa, NJ y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications editado por Innis, M. A. *et al.* (1990) Academic Press, Inc. San Diego, CA. Típicamente, se diseñan oligonucleótidos cebadores de PCR para incorporar cambios de nucleótidos a la secuencia codificante de proteínas que dan como resultado la sustitución con un resto de cisteína de un aminoácido en una posición específica dentro de la proteína. Tales cebadores oligonucleotídicos mutagénicos también pueden diseñarse para incorporar un resto de cisteína adicional en el extremo carboxi-terminal o amino-terminal de la secuencia codificante de proteínas. En este último caso también podrían incorporarse uno o más restos aminoácidos adicionales amino-terminal y/o carboxi-terminal del resto de cisteína añadido si eso fuera deseable. Además pueden diseñarse oligonucleótidos para incorporar restos de cisteína como mutaciones de inserción en posiciones específicas dentro de la secuencia codificante de proteína si eso fuera deseable. De nuevo, podría insertarse uno o más aminoácidos adicionales junto con el resto de cisteína y estos aminoácidos podrían posicionarse amino-terminales y/o carboxi-terminales al resto de cisteína.

La selección de secuencias para oligos mutagénicos se dicta por la posición en la que debe colocarse el resto de cisteína deseado y la propincuidad de los sitios de endonucleasa de restricción útiles. Generalmente es deseable colocar la mutación, es decir el segmento con emparejamiento erróneo cerca de la mitad del oligo para potenciar la hibridación del oligo con el molde. También es deseable que el oligo mutagénico abarque un sitio de restricción único de modo que el producto de PCR pueda escindirse para generar un fragmento que pueda fácilmente clonarse en un vector adecuado. Un ejemplo sería uno que pueda usarse para expresar la muteína o que proporcione sitios de restricción convenientes para escindir el gen mutado y clonarlo fácilmente en un vector de expresión tal. Generalmente es deseable emplear oligos mutagénicos por debajo de 80 bases de longitud y son más preferibles longitudes de 30-40 bases. En ocasiones los sitios de mutación y sitios de restricción se separan por distancias que son mayores que las que son deseables para síntesis de oligonucleótidos sintéticos. En tales casos, pueden emplearse múltiples ciclos de PCR para extender gradualmente la longitud del producto de PCR de modo que incluya el sitio de restricción útil deseado o pueden volver a obtenerse por ingeniería genética o volver a sintetizarse genes diana de mutagénesis para incorporar sitios de restricción en posiciones apropiadas. Como alternativa, también pueden emplearse variaciones de protocolos de mutagénesis por PCR, tal como el denominado "Método de Megacebador" (Barik, S. pág 277-286 en *Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications editado por White, B. A. (1993) Humana Press, Inc., Totowa, NJ) o "Corte y Empalme Génico por Extensión de solapamiento" (Horton, R M. pág 251-261 en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications editado por White, B. A. (1993) Humana Press, Inc., Totowa, NJ) para construir tales mutaciones.

A continuación, la célula hospedadora se expone a un agente de bloqueo de cisteína. En una realización, el agente de bloqueo está presente en el momento de rotura de la célula y preferiblemente se añade antes de romper las células. La rotura de células puede conseguirse por, por ejemplo, rotura mecánica tal como una célula de presión francesa, digestión enzimática, sonicación, homogeneización, agitación en vórtex de perlas de vidrio, tratamiento con detergentes, disolventes orgánicos, congelación y descongelación, molienda con alúmina o arena y similares (Bollag *et al.*, 1996).

En una realización alternativa, el agente de bloqueo de cisteína puede exponerse a la célula hospedadora antes, durante o después de que se induzca la célula hospedadora para que exprese la proteína deseada. Por ejemplo, la célula hospedadora puede cultivarse en presencia del agente de bloqueo de cisteína, lo que podría preferirse para expresión de proteínas que se secreten en el medio tales como eritropoyetina, por ejemplo. Como alternativa, antes de o en el momento de, exponer la célula hospedadora al agente de bloqueo de cisteína, puede inducirse que la célula hospedadora exprese la proteína deseada, como una proteína secretada en el periplasma o medio, o como una proteína citoplásmica. Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para inducir tal expresión en el citoplasma o para dirigir la secreción dependiendo del origen celular, incluyendo, por ejemplo, los métodos descritos en los ejemplos posteriores. Se ha usado una amplia diversidad de péptidos señal de forma exitosa para transportar proteínas al espacio periplásmico. Los ejemplos de estos incluyen secuencias señal procariotas tales como ompA, still, señal PhoA (Denefle *et al.*, 1989), OmpT (Johnson *et al.*, 1996), LamB y OmpF (Hoffman y Wright, 1985), beta-lactamasa (Kadonaga *et al.*, 1984), enterotoxinas LT-A, LTB (Morioka-Fujimato *et al.*, 1991) y proteína A de *S. aureus* (Abrahmsen *et al.*, 1986). También se conocen varias secuencias señal sintéticas no naturales que facilitan la secreción de ciertas proteínas por los expertos en la materia.

Para proteínas secretadas al periplasma, puede usarse un tratamiento de choque osmótico para romper selectivamente la membrana exterior de las células hospedadoras con la liberación resultante de proteínas periplásmicas. El tampón de choque osmótico puede ser cualquiera conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el tampón de choque osmótico y procedimientos descritos en Hsiung *et al.* (1986), o como se describe en los ejemplos posteriores. Para proteínas secretadas al medio, preferiblemente el medio debería contener el agente de bloqueo de cisteína durante el tiempo que las células expresan y secretan la proteína. El agente de bloqueo de cisteína también podría añadirse al medio después de secreción de la proteína pero antes de purificación de la proteína.

Puede añadirse el agente de bloqueo de cisteína al medio de cultivo a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 μM a aproximadamente 100 mM. Preferiblemente, la concentración de agente de bloqueo de cisteína en el medio es de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 5 mM.

Aunque sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que los agentes de bloqueo de cisteína usados en los presentes métodos se unen covalentemente al resto de cisteína "libre", formando un disulfuro mezclado, estabilizando de este modo el resto de cisteína libre y evitando la multimerización y agregación de la proteína. Como alternativa, la presencia de un agente oxidante en los tampones de choque osmótico puede aumentar el proceso de replegamiento de proteínas en caso de que se haya producido renaturalización incompleta después de la secreción de la proteína al espacio periplásmico. Sin embargo, como se ha observado anteriormente, el replegamiento de proteína periplásmica puede ser ineficaz. Por esta razón se cree que la adición de cistina a tampones de choque osmótico también puede aumentar la recuperación de proteínas recombinantes que contienen un número par de restos de cisteína, incluso si las cisteínas normalmente forman enlaces disulfuro. Además, los inventores creen que puede ser ventajoso añadir cistina o compuestos similares a los medios de fermentación durante el crecimiento bacteriano debido a que estos compuestos deberían difundirse en el periplasma debido a la naturaleza porosa de la

membrana exterior bacteriana. Puede conseguirse plegamiento proteico y bloqueo de la cisteína libre antes de la recuperación y lisis celular. La estabilización proteica temprana protege contra proteólisis y puede contribuir a mayores rendimientos de recuperación de proteínas recombinantes.

5 Pueden usarse varios compuestos sensibles a tiol como agentes de bloqueo de cisteína para estabilizar proteínas que contienen cisteínas libres. Además de cistina, los agentes de bloqueo también pueden incluir reactivos que contienen enlaces disulfuro tales como cistamina, ácido ditioglicólico, glutatión oxidado, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico (reactivo de Ellman), disulfuros de piridina, compuestos del tipo R-S-S-CO-OCH₃, otros derivados de cistina tales como diformilcistina, diacetilcistina, diglicilcistina, dialanilcistina diglutaminilcistina, cistinildiglicina, cistinildiglutamina, dianhidruro de dialanilcistina, fenilhidantoína de cistina, homocistina, ácido ditioldipropiónico, dimetilcistina o cualquier ditiol o agente químico capaz de experimentar una reacción de intercambio de disulfuro. También pueden usarse haluros de sulfenilo para preparar disulfuros mezclados.

15 En la etapa final del método general, la proteína deseada se recupera y purifica de la fracción citoplásmica soluble, de la fracción periplásmica soluble o la fracción soluble del medio. Puede usarse cualquier medio para recuperar y purificar proteínas del medio, fracción citoplásmica o periplásmica. Dichos métodos de recuperación y purificación se conocen o se determinan fácilmente por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, procedimientos de centrifugación, filtración, diálisis, cromatografía, incluyendo de exclusión de tamaño y similares. Un método adecuado para la recuperación y purificación de una proteína deseada dependerá, en parte, de las propiedades de la proteína y el uso pretendido.

20 La presente invención proporciona adicionalmente nuevos métodos para producir interferón soluble, particularmente interferón alfa, que da como resultado un aumento significativo del porcentaje del interferón recuperado que se ha procesado de forma apropiada. Estos métodos incluyen cultivar células hospedadoras capaces de expresar interferón a un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5 y preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Los informes publicados (Voss *et al.* (1994)) que usaron un pH mayor solo dieron como resultado 50 % de interferón procesado de forma apropiada, mientras que los nuevos métodos de la presente invención a pH inferiores recuperaron aproximadamente 80-90 %.

30 Se realizó un descubrimiento de que ciertas de las variantes de cisteína de hGH monoméricas formaron proteínas de hGH diméricas enlazadas por disulfuro durante los procedimientos de cromatografía usados para purificar estas proteínas. Los dímeros de hGH ligados por disulfuro se formaron cuando se retiró la cistina de los tampones de columna. Se desarrollaron nuevos procedimientos para purificar las proteínas de hGH diméricas ligadas por disulfuro debido a que las proteínas de hGH diméricas ligadas por disulfuro se comportaron de forma diferente que las proteínas de hGH monoméricas durante las etapas de cromatografía de columna usadas para purificar las proteínas. De forma inesperada, se descubrió que las proteínas de hGH diméricas ligadas por disulfuro eran biológicamente activas en bioensayos *in vitro*. Las proteínas de hGH diméricas ligadas por disulfuro homogéneas biológicamente activas son nuevas. En consecuencia, la presente invención se refiere también adicionalmente a estas proteínas de hGH diméricas, ligadas por disulfuro homogéneas biológicamente activas. También se contemplan multímeros de mayor orden, incluyendo trimeros, tetrameros y similares, como se describe en los ejemplos posteriores.

40 Las proteínas purificadas pueden después procesarse adicionalmente si se desea. Por ejemplo, las proes pueden pegilarse en el sitio de cisteína libre con diversos reactivos de PEG sensibles a cisteína y posteriormente purificarse como proteínas monopegiladas. Se define que el término "monopegilado" significa una proteína modificada por unión covalente de una molécula de PEG sencilla en un sitio específico en la proteína. Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, los métodos descritos en los ejemplos posteriores, particularmente Ejemplo 11.

50 Braxton (1998) enseña métodos para pegilar muteínas de cisteína de proteínas y en particular muteínas de cisteína de GH y eritropoyetina. Braxton (1998) enseña específicamente que los tampones usados para pegilar las muteínas de cisteína no deberían contener un agente reductor. Los ejemplos de agentes reductores proporcionados por Braxton (1998) son beta-mercaptoetanol (BME) y ditiotreitól (DT). Cuando se usaron procedimientos similares para pegilar muteínas de cisteína de GH, eritropoyetina e interferón alfa, se descubrió que las muteínas de cisteína no se pegilaban. Se ha descubierto ahora que se requiere tratamiento de las muteínas de cisteína purificadas con un agente reductor para que las proteínas se pegilen. Aunque sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, los inventores creen que se requiere el agente reductor para reducir el disulfuro mezclado y exponer el resto de cisteína libre en la proteína de modo que en la cisteína libre pueda reaccionar con el reactivo de PEG. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a métodos para pegilar muteínas de cisteína de GH, eritropoyetina, interferón alfa y otras proteínas que contengan 2N+1 restos de cisteína, proteínas que contengan 2N restos de cisteína en las que dos o más de los restos de cisteína son libres, particularmente las muteínas y proteínas en las que el resto de cisteína libre está bloqueado por un disulfuro mezclado.

65 La presente invención se refiere adicionalmente a variantes de proteína monopegilada purificadas producidas por los métodos descritos en el presente documento que no son biológicamente activos, pero también conservan actividad específica alta en ensayos de proliferación de células de mamífero dependientes de proteínas. Tales variantes proteicas incluyen, por ejemplo, las siguientes muteínas de cisteína monopegiladas purificadas: hGH, EPO e IFN

alfa. Por ejemplo, las actividades biológicas *in vitro* de las variantes de hGH monopegiladas fueron de 10 a 100 veces mayores que la actividad biológica de hGH que se ha pegilado usando reactivos de NHS-PEG.

En una realización de la hGH monopegilada, el polietilenglicol se une al bucle C-D de hGH y la hGH monopegilada resultante tiene una CE_{50} menor de aproximadamente 110 ng/ml (5 nM), preferiblemente menos de aproximadamente 50 ng/ml (2,3 nM). Como alternativa, el resto de polietilenglicol puede unirse a una región proximal a la hélice A de hGH y la hGH monopegilada resultante tiene una CE_{50} menor de aproximadamente 110 ng/ml (5 nM), preferiblemente menos de 11 ng/ml (0,5 nM) y más preferiblemente menos de aproximadamente 2,2 ng/ml (0,1 nM).

En una realización de la EPO monopegilada, el polietilenglicol se une al bucle C-D de EPO y la EPO monopegilada resultante tiene una CE_{50} menor de aproximadamente 1000 ng/ml (21 nM), preferiblemente menos de aproximadamente 100 ng/ml (aproximadamente 6 nM), más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ng/ml (aproximadamente 0,6 nM) y más preferiblemente menos de aproximadamente 1 ng/ml (aproximadamente 0,06 nM). Como alternativa, el resto de polietilenglicol puede unirse al bucle A-B de EPO y la EPO monopegilada resultante tiene una CE_{50} menor de aproximadamente 100 ng/ml (aproximadamente 5 nM), preferiblemente menos de 20 ng/ml (aproximadamente 1 nM) y más preferiblemente menos de aproximadamente 1 ng/ml (aproximadamente 0,05 nM).

En una realización del IFN- α monopegilado, el polietilenglicol se une a la región proximal a la hélice A o IFN alfa y el IFN alfa monopegilado resultante tiene una CE_{50} menor de aproximadamente 100 pg/ml (aproximadamente 5 pM), más preferiblemente menos de aproximadamente 50 pg/ml (aproximadamente 2,5 pM) y más preferiblemente aproximadamente 22 ng/ml (aproximadamente 1,2 nM). Como alternativa, el resto de polietilenglicol puede unirse al bucle C-D de IFN- $\alpha 2$ y el IFN- α monopegilado resultante tiene una CE_{50} menor de aproximadamente 100 pg/ml (aproximadamente 5 pM).

Existen más de 25 genes de IFN- α distintos (Pestka *et al.*, 1987). Los miembros de la familia de IFN- α comparten diversos grados de homología de aminoácidos y muestran conjuntos solapantes de actividades biológicas. Están en diversas etapas de desarrollo clínico IFN- α recombinantes no naturales creados a través de unión entre sí de regiones de diferentes proteínas de CFN- α (Horisberger y DiMarco, 1995). También se ha descrito un interferón "consenso" no natural (Blatt *et al.*, 1996), que incorpora el aminoácido más habitual en cada posición de IFN- α . Los sitios apropiados para pegilar muteínas de cisteína de IFN- $\alpha 2$ deberían poder aplicarse directamente a otros miembros de la familia de genes de IFN- α y a IFN- α no naturales. Kinstler *et al.*, (1996) describieron interferón consenso monopegilado en el que la proteína está preferentemente monopegilada en el resto de metionina N-terminal, no natural. La bioactividad de la proteína pegilada se redujo aproximadamente 5 veces en relación con el interferón consenso no modificado (Kinstler *et al.*, 1996).

El "resto de PEG" útil para unirse a las variantes de cisteína de la presente invención para formar proteínas "pegiladas" incluye cualquier polímero adecuado, por ejemplo un polioli de cadena ramificada o lineal. Un polioli preferido es polietilenglicol, que es un polímero sintético compuesto de unidades de óxido de etileno. Las unidades de óxido de etileno pueden variar de modo que pueden obtenerse variantes de proteína pegilada con pesos moleculares aparentes por cromatografía de exclusión de tamaño que varían de aproximadamente 30 a 500.000. El tamaño del resto de PEG influye directamente en su semivida en circulación (Yamaoka *et al.* (1994)). En consecuencia, podrían obtenerse por ingeniería genética variantes proteicas con diferentes semividas en circulación para aplicaciones terapéuticas específicas o regímenes de dosificación preferidos variando el tamaño o estructura del resto de PEG. Por lo tanto, la presente invención abarca variantes de proteína de GH que tienen un tamaño molecular aparente mayor de aproximadamente 30 kDa y más preferiblemente más de aproximadamente 70 kDa según se determina por cromatografía de exclusión de tamaño, con una CE_{50} menor de aproximadamente 400 ng/ml (18 nM), preferiblemente menos de 10 ng/ml (5 nM), más preferiblemente menos de aproximadamente 10 ng/ml (0,5 nM) e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 2,2 ng/ml (0,1 nM). La presente invención abarca adicionalmente variantes de proteína EPO que tienen un tamaño molecular aparente mayor de aproximadamente 30 kDa y más preferiblemente mayor de aproximadamente 70 kDa según se determina por cromatografía de exclusión de tamaño, con una CE_{50} menor de aproximadamente 1000 ng/ml (21 nM), preferiblemente menor de 100 ng/ml (6 nM), más preferiblemente menor de aproximadamente 10 ng/ml (0,6 nM) e incluso más preferiblemente menor de aproximadamente 1 ng/ml (0,06 nM). La presente invención abarca adicionalmente variantes de proteína de IFN alfa (IFN- α) que tienen un peso molecular aparente mayor de aproximadamente 30 kDa y más preferiblemente mayor de aproximadamente 70 kDa según se determina por cromatografía de exclusión de tamaño, con una CE_{50} menor de aproximadamente 1900 pg/ml (100 pM), preferiblemente menor de 400 pg/ml (21 pM), más preferiblemente menor de 100 pg/ml (5 nM) e incluso más preferiblemente menor de aproximadamente 38 pg/ml (2 pM).

El grupo terminal de PEG para modificación de cisteína incluye pero sin limitación restos de vinilsulfona, maleimida y yodoacetilo. El grupo terminal de PEG debería ser específico para tres tioles produciéndose la reacción en condiciones que no son perjudiciales para la proteína.

También pueden prepararse variantes de hGH antagonistas usando una GH variante con cisteína añadida en la que la derivación química no interfiere con la unión al receptor pero evita el proceso de señalización. Las condiciones

que se beneficiarían de la administración de un antagonista de GH incluyen acromegalia, enfermedades vasculares del ojo, nefropatía diabética, reestenosis después de angioplastia y tumores malignos sensibles a hormona del crecimiento.

5 Como se usa en el presente documento, el término “derivado” se refiere a cualquier variante de una proteína expresada y recuperada por los presentes métodos. Tales variantes incluyen, pero sin limitación, versiones pegiladas, dímeros y otras variantes de mayor orden, variantes de aminoácidos, proteínas de fusión, cambios en carbohidratos, fosforilación u otros grupos unidos hallados en proteínas naturales y cualquier otra variante descrita en el presente documento.

10 Los compuestos producidos por los presentes métodos pueden usarse para una diversidad de usos *in vitro* e *in vivo*. Las proteínas y sus derivados de la presente invención pueden usarse para fines de investigación, diagnósticos o terapéuticos que se conocen por sus homólogos de tipo silvestre, naturales o modificados previamente conocidos. Los usos *in vitro*, incluyen, por ejemplo, el uso de la proteína para exploración, detección y/o purificación de una de las proteínas.

15 Para usos terapéuticos, un experto en la materia puede determinar fácilmente la dosis, frecuencia de dosificación y vía de administración apropiadas. Los factores en la realización de tales determinaciones incluyen, sin limitación, la naturaleza de la proteína a administrar, la afección a tratar, la conformidad potencial del paciente, el peso y la edad del paciente y similares. Los compuestos de la presente invención también pueden usarse como vehículos de suministro para potenciación de la semivida en circulación de los agentes terapéuticos que están unidos o para dirigir el suministro a una diana específica dentro del cuerpo.

20 No se pretende que los siguientes ejemplos sean limitantes, sino solamente ejemplares de realizaciones específicas de la invención.

Ejemplo 1

Desarrollo de bioensayo *in vitro* para hormona de crecimiento humana

30 Se desarrolló un ensayo de proliferación celular de hGH que usa la línea celular FDC-P1 murina transfectada de forma estable con el receptor de GH de conejo (Rowlinson *et al.*, 1995). La línea celular FDC-P1 de ratón se obtuvo de la colección americana de cultivos tipo y se propagó de forma rutinaria en medio RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal 10 %, penicilina 50 μ l/ml, estreptomycin 50 μ l/ml, glutamina 2 mM e IL-3 de ratón 17-170 unidades/ml (medio de FDC-P1).

A. Clonación de un ADNc que codifica el receptor de GH de conejo

40 El receptor de GH de conejo se clonó por PCR usando cebador directo BB3 (5'-CCCCGATCCGCCACCATGGATCTCTGGCAGCTGCTGTT-3') (SEC ID N°: 1) y cebador inverso BB36 (5'-CCCCGTCGACTCTAGAGCCATTAGATACAAAGCTCT TGGG-3') (SEC ID N°: 2). BB3 hibrida con la secuencia de ADN que codifica la metionina iniciadora y parte amino-terminal del receptor. BB3 contiene una secuencia KOZAK optimizada antes de la metionina iniciadora y un sitio *Bam* HI para fines de clonación. BB36 hibrida con la región 3' no traducida del ARNm del receptor de Gh de conejo y contiene sitios de restricción *Xba* I y *Sal* I para fines de clonación. Se usó ARNm poli(A)⁺ de hígado de conejo (obtenido de CLONTECH, Inc.) como el sustrato en síntesis de primera cadena de ADNc monocatenario para producir un molde para amplificación por PCR. La síntesis de primera cadena de ADNc monocatenario se consiguió usando un kit de síntesis de ADNc de primera cadena para RT-PCR (AMV) de Boehringer Mannheim Corp. Se realizaron síntesis de ADNc de primera cadena paralelas usando hexámeros aleatorios o BB36 como el cebador. Se llevaron a cabo reacciones de PCR posteriores usando los productos de las síntesis de primera cadena como moldes con los cebadores BB3 y BB36. El producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb esperado se observó en reacciones de PCR usando ADNc cebado con hexámero aleatorio o cebado con BB36 como molde. El ADNc cebado con hexámero aleatorio se digirió con *Bam* HI y *Xba* I, que genera dos fragmentos (aproximadamente 365 pb y aproximadamente 1600 pb) debido a que el gen del receptor de GH de conejo contiene un sitio *Bam* HI interno. Ambos fragmentos se purificaron en gel. El ADNc del receptor de GH de conejo de longitud completa se clonó después en dos etapas. Primero se clonó el fragmento *Bam* HI - *Xba* I de aproximadamente 1600 pb en pCDNA3.1(+) (Invitrogen Corporation) que se había digerido con estas mismas dos enzimas. Estos clones se obtuvieron fácilmente a frecuencias razonables y no mostraron pruebas de delecciones según se determinó por digestiones de restricción y secuenciación posterior. Para completar el clon de ADNc de receptor de conejo, se digirió uno de los plásmidos secuenciados que contenían el fragmento *Bam* HI - *Xba* I de 60 1600 pb con *Bam* HI, se trató con fosfatasa alcalina de ternero, se purificó en gel y se ligó con el fragmento de *Bam* HI de aproximadamente 365 pb purificado en gel que contiene la parte 5' del gen del receptor de GH de conejo. Se seleccionaron transformantes de esta ligación y se analizaron por digestión de restricción y PCR para confirmar la presencia del fragmento de aproximadamente 365 pb y para determinar su orientación en relación con el segmento distal del gen del receptor de GH de conejo. Se verificó después la secuencia para un clon de longitud completa. Este plásmido, designado pBBT118, se usó para transfectar de forma estable células FDC-P1.

B. Selección de células FDC-P1 transfectadas de forma estable que expresan el receptor de GH de conejo

Se preparó ADN de pBBT118 sin endotoxina usando un "Kit de Purificación de Plásmido sin Endo" de Qiagen y se usó para transfectar células FDC-P1. Se obtuvo IL-3 de ratón de R&D Systems. Se transfectaron células FDC-P1 con plásmido pBBT118 usando reactivo lipídico cationizado DMRIE-C obtenido de GIBCO, siguiendo las direcciones recomendadas por el fabricante. Brevemente, se formó complejo con 4 µg de ADN plasmídico con 4-30 µl del reactivo DMRIE-C en 1 ml de medio OptiMEM (GIBCO) durante 45 minutos en placas de cultivo tisular de seis pocillos. Después de la formación de complejo, se añadieron 2×10^6 células FDC-P1 en 200 µl de medio OptiMEM complementado con IL-3 de ratón a cada pocillo y la mezcla se dejó durante 4 horas a 37 °C. La concentración de IL-3 de ratón final fue de 17 unidades/ml. Se añadieron dos ml de medio de FDC-P1 que contenía suero bovino fetal al 15 % a cada pocillo y las células se dejaron durante una noche a 37 °C. Al día siguiente las células transfectadas se transfirieron a matraces de cultivo tisular T-75 que contenían 15 ml de medio de FDC-P1 complementado con IL-3 (17 U/ml), hGH (5 nM) y suero de caballo al 10 % en vez de suero de ternero fetal. Se usó suero de caballo debido a informes de que el suero de ternero fetal contiene una actividad promotora del crecimiento para células FDC-P1. Tres días después las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio FDC-P1 fresco que contenía G418 400 µg/ml, IL-3 17 U/ml, hGH 5 nM, suero de caballo 10 % y se incubó a 37 °C. El medio se cambió cada pocos días. Las células de cada transfección se dividieron en matraces de cultivo tisular T-75 que contenían medio fresco e IL-3 de ratón (17 U/ml) o hGH (5 nM). Se obtuvieron células resistentes a G418 de los matraces que contenían tanto IL-3 como hGH. Los transformantes usados en los bioensayos se originaron de matraces que contenían hGH. Se seleccionaron doce líneas celulares independientes por dilución limitante. Cinco de las líneas celulares (GH-R3, -R4, -R5, -R6 y -R9) mostraron una buena respuesta proliferativa a hGH. Los experimentos preliminares indicaron que la CE50 para hGH fue similar para cada línea celular, aunque la magnitud de la respuesta de crecimiento varió dependiendo de la línea. La línea celular GH-R4 se estudió en gran detalle y se usó para los ensayos presentados posteriormente. Las líneas celulares se propagaron de forma rutinaria en medio RPMI 1640 que contenía suero de caballo 10 %, penicilina 50 Unidades/ml, estreptomycinina 50 µg/ml, glutamina 2 mM, G418 400µg/ml y hGH o rhGH de tiroides 2-5 nM.

C. Desarrollo de un bioensayo de hGH usando FDC-P1 que expresan el receptor de GH de conejo

Se desarrolló una versión modificada del ensayo de proliferación celular de MTT descrito por Rowlinson *et al.* (1995) para medir la bioactividad de hGH. El ensayo de los inventores mide la captación y reducción del colorante MTS, que crea un producto soluble, en lugar de MTT, que crea un producto insoluble que debe solubilizarse con disolventes orgánicos. La ventaja de usar MTS es que la absorbancia de los pocillos puede determinarse sin la necesidad de lisar las células con disolventes orgánicos.

Las células GH-R4 se lavaron tres veces con medio RPMI 1640 sin rojo fenol y se suspendieron en medio de ensayo (RPMI 1640 sin rojo fenol, suero de caballo 10 %, penicilina 50 Unidades/ml, estreptomycinina 50 µg/ml, G418 400 µg/ml) a una concentración de 1×10^5 células/ml. Se añadieron 50 µl de la suspensión celular (5×10^3 células) a pocillos de una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie de tres veces de muestras de proteína en medio de ensayo y se añadieron a pocillos de microtitulación en un volumen de 50 µl, produciendo un volumen final de 100 µl por pocillo. Las muestras proteicas se ensayaron en pocillos por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C en un incubador de cultivo tisular de CO₂ 5 % modificado durante 66-72 horas, añadiéndose en dicho momento 20 µl de una mezcla de reacción de MTS/PES (PES es un acoplador de electrones) (CellTiter 96 Aqueous One, Promega Corporation Solution Reagent) a cada pocillo. La absorbancia de los pocillos a 490 nm se midió 2-4 horas después. Se calcularon las medias de los valores de absorbancia +/- desviaciones típicas para los pocillos por triplicado. Los pocillos de control contenían medio pero no células. Se restaron los valores de absorbancia para los pocillos de control (típicamente 0,06 - 0,2 unidades de absorbancia) de los valores de absorbancia para los pocillos de muestra. Los experimentos de control demostraron que las señales de absorbancia se correlacionaban con el número de células hasta los valores de absorbancia de 2. Todos los ensayos incluyeron un patrón de GH de tiroides humana. Se realizaron experimentos que utilizan la línea celular FDC-P1 parental como se ha descrito anteriormente excepto que el medio de ensayo no contenía G418 y el suero de ternero fetal sustituyó al suero de caballo.

Ejemplo 2**Clonación y expresión de rhGH****A. Clonación de un ADNc que codifica hormona del crecimiento humana (GH)**

Se amplificó un ADNc de GH humana de ADNc monocatenario de tiroides humana (disponible en el mercado de CLONTECH, Inc., Palo Alto, CA) usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los cebadores BB1 y BB2. La secuencia de BB1 es (5'-GGGGGTGACCATATGTTCCCAACCATTCCCTTATCCAG-3') (SEC ID N°: 3). La secuencia de BB2 es (5'-GGGGGATCCTCACTAGAAGCCACAGCTGCCCTC - 3') (SEC ID N°: 4). El cebador BB1 se diseñó para codificar una metionina iniciadora antes del primer aminoácido de GH madura, fenilalanina y los sitios *Sal* I y *Nde* I para fines de clonación. El cebador inverso BB2 contiene un sitio *Bam* HI para

5 fines de clonación. Las reacciones de PCR contenían 20 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, tampón de PCR 1X (tampón Perkin-Elmer que contenía MgCl₂), concentración de 200 μM de cada uno de los cuatro nucleótidos dA, dC, dG y dT, 2 ng de ADNc monocatenario, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Perkin-Elmer) y 2,5 unidades de Pfu polimerasa (Stratagene, Inc). Las condiciones de reacción de PCR fueron: 96 °C durante 3 minutos, 35 ciclos de (95 °C, 1 minuto; 63 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto), seguido de 10 minutos a 72 °C. El termociclador empleado fue el AmpliTron II Thermal Cycler (Thermolyne). El producto de PCR de aproximadamente 600 pb se digirió con *Sal* I y *Bam* HI, se purificó en gel y se clonó en plásmido digerido de forma similar pUC19 (disponible en el mercado de New England Biolabs, Beverly, MA). La mezcla de ligación se transforma en cepa de *E. coli* DH5alfa y los transformantes se seleccionaron en placas LB que contenían ampicilina. Se dejaron crecer varias colonias durante una noche en medio LB y se aisló ADN plasmídico usando kits de aislamiento de ADN miniplasmídicos obtenidos de Qiagen, Inc (Valencia, CA). Se determinó que el clon LB6 tenía la secuencia de ADN correcta.

15 Para expresión en *E. coli*, el clon LB6 se digirió con *Nde* I y *Eco* RI, el fragmento de aproximadamente 600 pb se purificó en gel y se clonó en el plásmido pCYB1 (disponible en el mercado de New England Biolabs, Beverly, MA) que se había digerido con las mismas enzimas y se había tratado con fosfatasa alcalina de ternero. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5alfa y los transformantes se seleccionaron en placas de ampicilina LB. El ADN plasmídico se aisló de varios transformantes y se exploró por digestión con *Nde* I y *Eco* RL. Se identificó un clon correcto y se nombró pCYB1: wtGH (pBBT120). Este plásmido se transformó en las cepas de *E. coli* JM109 o W3110 (disponibles de New England Biolabs y la colección americana de cultivos tipo).

20 B. Construcción de stII-GH

Se usó el clon de GH de tipo silvestre LB6 (pUC19: GH de tipo silvestre) como el molde para construir un clon de GH que contenía la secuencia señal de stII de *E. coli*. Debido a su longitud, la secuencia de stII se añadió en dos reacciones de PCR secuenciales. La primera reacción usó cebador directo BB 12 y cebador inverso BB 10. BB 10 tiene la secuencia (5' CGCGGATCCGATTAGAATCCACAGCTCCCTC 3') (SEC ID N°: 5). BB12 tiene la secuencia (5'-GCATCTATGTTTCGTTTTCTCTATCGCTACCAACGCTTACGCATTCCCAACCATTCCCTTATCCAG-3') (SEC ID N°: 6). Las reacciones de PCR fueron como se describe para amplificar GH de tipo silvestre. El producto de PCR de aproximadamente 630 pb se purificó en gel usando el kit de extracción en gel Qiaex II (Qiagen, Inc), se diluyó 50 veces en agua y se usaron 2 μl como molde para la segunda reacción de PCR. La segunda reacción de PCR usó cebador inverso BB10 y cebador directo BB11. BB11 tiene la secuencia (5'CCCCCTCTAGACATATGAAGAAGAACATCGCATTCTGCTGGCATCTATGTTTCGTTTTCTCTATCG-3') (SEC ID N°: 7). El cebador BB11 contiene sitios *Xba*I y *Nde*I para fines de clonación. Las condiciones de PCR fueron como se ha descrito para la primera reacción. El producto de PCR de aproximadamente 660 pb se digirió con *Xba*I y *Bam*HI, se purificó en gel y se clonó en plásmido cortado de forma similar pCDNA3.1(+) (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). Se determinó que el clon de pCDNA3.1(+):stII-GH(5C) o "5C" tenía la secuencia de ADN correcta.

40 El clon "5C" se escindió con *Nde*I y *Bam*HI y se clonó en pBBT108 cortado de forma similar (un derivado de pUC19 que carece de un sitio *Pst* I, este plásmido se describe posteriormente). Se identificó un clon con el inserto correcto después de digestión con estas enzimas. Este clon, designado pBBT111, se digirió con *Nde* I y *Sal* I, conteniendo el fragmento de 660 pb el gen de fusión de stII-GH, se purificó en gel y se clonó en el vector de expresión plasmídico pCYB1 (New England Biolabs) que se había digerido con las mismas enzimas y se trató con fosfatasa alcalina de ternero. Se identificó un plásmido recombinante que contenía la inserción de stII-GH por digestiones de endonucleasa de restricción. Se seleccionó un aislado tal para estudios adicionales y se designó pBBT114. Este plásmido se transformó en las cepas de *E. coli* JM109 o W3110 (disponibles de New England Biolabs y la colección americana de cultivos tipo).

45 C. Construcción de ompA-GH

50 Se usó clon de GH de tipo silvestre LB6 (pUC19: GH de tipo silvestre) como el molde para construir un clon de GH que contenía la secuencia señal ompA de *E. coli*. Debido a su longitud, la secuencia de ompA se añadió en dos reacciones de PCR secuenciales. La primera reacción usó el cebador directo BB7 (5'GCAGTGGC ACTGGCTGGTTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCTTCCCAACCATTCCCTTATCCAG 3') (SEC ID N°: 8) y cebador inverso BB10: (5' CGCGGATCCGATTAGAATCCACAGCTCCCTC 3') (SEC ID N°: 5). Las reacciones de PCR fueron como se ha descrito para amplificar GH de tipo silvestre excepto que se usaron aproximadamente 4 ng de plásmido LB6 como el molde en lugar de ADNc monocatenario y las condiciones de PCR fueron 96 °C durante 3 minutos, 30 ciclos de (95 °C durante 1 minuto; 63 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto) seguido de 72 °C durante 10 minutos. El producto de PCR de aproximadamente 630 pb se purificó en gel usando el kit de extracción en gel Qiaex II (Qiagen, Inc), se diluyó 50 veces en agua y se usaron 2 μl como molde para la segunda reacción de PCR. La segunda reacción de PCR usó cebador inverso BB10 y cebador directo BB6: (5'CCCCG TCGACACATATGAAGAAGACAGCTATCGCGATTGCGACTGGCTGGTTTTC 3') (SEC ID N°: 9). Las condiciones de PCR fueron como se ha descrito para la primera reacción. El producto de PCR de aproximadamente 660 pb se purificó en gel, se digirió con *Sal* I y *Bam* H1 y se clonó en pUC19 (New England Biolabs) que se cortó con *Sal* I y *Bam* H1 o pCDNA3.1(+) (Invitrogen) que se había cortado por *Xho* I y *Bam* H1 (*Sal* I y *Xho* I producen salientes monocatenarios compatibles). Cuando se secuenciaron varios clones, se descubrió que todos los clones pUC19 (8/8) contenían errores en la región de la secuencia de ompA. Solamente se secuenció un clon de

pCDNA3.1(+) y contenía una ambigüedad de secuencia en la región de ompA. Para generar una fusión de ompA-GH correcta, se recombinaron segmentos génicos de dos clones secuenciados, que contenían diferentes errores separados por un sitio de restricción conveniente y se clonaron en el derivado de pUC19 que carecía del sitio *Pst* I (véase pBBT108 descrito posteriormente). El plásmido resultante, denominado pBBT112, porta el gen de fusión ompA-GH clonado como un fragmento de *Nde* I - *Bam* HI en estos mismos sitios en pBBT108. El plásmido se designa pBBT112 y se usa en mutagénesis específica basada en PCR de GH como se describe posteriormente.

D. Construcción de *Pst* I-pUC19 (pBBT108)

Para facilitar la mutagénesis del gen de GH clonado para construcción de mutaciones de sustitución e inserción de cisteínas seleccionadas, se construyó un derivado del plásmido pUC19 (New England BioLabs) sin un sitio *Pst* I como sigue. Se digirió ADN plasmídico de pUC19 con *Pst* I y se trató posteriormente a 75 °C con ADN polimerasa Pfu (Stratagene) usando el tampón de reacción proporcionado por el proveedor complementado con dNTP 200 µM. En estas condiciones la polimerasa digerirá el saliente monocatenario 3' creado por digestión con *Pst* I pero no digerirá la región bicatenaria y el resultado neto será la delección de las 4 bases monocatenarias que comprenden las 4 bases medias del sitio de reconocimiento de *Pst* I. La molécula resultante tiene extremos bicatenarios, es decir "romos". Después de estas reacciones enzimáticas el monómero lineal se purificó en gel usando el kit de extracción en gel Qiaex II (Qiagen, Inc). Este ADN purificado se trató con ADN ligasa T4 (New England BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se digirió con *Pst* I y se usó para transformar *E. coli* DH5alfa. Se seleccionaron transformantes y se analizaron por digestión de restricción con *Pst* I y *Bam* HI. Uno de los transformantes que no se escindió por *Pst* I pero se escindió en el sitio *Bam* HI cercano se seleccionó y se designó pBBT108.

E. Expresión de met-hGH y stII-hGH en *E. coli*

pBBT120 que codifica met-hGH y pBBT114 que codifica stII-hGH se transformaron en la cepa de *E. coli* W3110. El vector parental pCYB1 también se transforma en W3110. Se dio a las cepas resultantes las siguientes designaciones:

BOB130: W3110 (pCYB1) = solamente vector

BOB133: W3110 (pBBT120) = met-hGH

BOB132: W3110 (pBBT114) = stII-hGH

Estas cepas se cultivaron durante una noche a 37 °C en caldo Luria (LB) que contenía ampicilina 100 µg/ml. Los cultivos de una noche saturados se diluyeron a aproximadamente 0,025 DO a A_{600} en LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se incubaron a 37 °C en matraces de agitación. Cuando las DO de cultivo alcanzaron aproximadamente 0,25 - 0,5 se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir expresión de las proteínas recombinantes. Para los experimentos iniciales, se tomaron muestras de los cultivos a 0, 1, 3, 5 y aproximadamente 16 horas después de la inducción. Las muestras de cultivos inducidos y no inducidos se sedimentaron y resuspendieron en tampón de muestra SDS-PAGE con la adición de β-mercaptoetanol (BME) 1 % cuando fuera deseable. Se sometió a las muestras a electroforesis en geles de poliacrilamida Tris-glicina al 14 % prefabricados. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie o se analizaron por transferencia de Western.

La tinción de Coomassie de lisados celulares completos de las cepas BOB133, que expresaban met-hGH, y BOB132, que expresaban stII-hGH, mostró una banda de aproximadamente 22 kDa que migraba conjuntamente con un patrón de rhGH purificado obtenido de Research Diagnostics Inc. La banda de rhGH fue más prominente en cultivos inducidos después de inducción durante una noche. Las transferencias de western usando un antisuero anti-hGH de conejo policlonal obtenido de United States Biological, Inc. confirmaron la presencia de rhGH en lisados de cultivos inducidos de BOB132 y BOB133 a tanto 3 como 16 horas después de la inducción. No se detectó rhGH por transferencia de western de cultivos inducidos de la cepa de control BOB130 (solamente vector) a las 3 o 16 horas después de la inducción.

Se preparó un cultivo inducido de BOB132 (que expresaba stII-hGH) como se ha descrito anteriormente y se sometió a choque osmótico basándose en el procedimiento analítico de Koshland y Botstein (1980). Este procedimiento rompe la membrana exterior de *E. coli* y libera los contenidos del periplasma al medio circundante. La centrifugación posterior separa los componentes periplásmicos solubles (recuperados en el sobrenadante) de los componentes citoplásmicos, periplásmicos insolubles y asociados a células (recuperados en el sedimento). Específicamente, se cultivó la cepa de *E. coli* W3110 que contenía el plásmido st-II hGH a 37 °C durante una noche en LB que contenía ampicilina 100 µg/ml. El cultivo de una noche saturado se diluyó a DO 0,03 a A_{600} en 25 ml de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se incubó a 37 °C en un matraz de agitación de 250 ml. Cuando la DO del cultivo alcanzó aproximadamente 0,4, se añadió IPTG 100 mM para una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante. El cultivo inducido se incubó después a 37 °C durante una noche (aproximadamente 16 horas). El cultivo de una noche inducido alcanzó una DO de 3,3 a A_{600} y 4 DO (1,2 ml) se centrifugaron en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sedimento

celular se resuspendió a DO aproximadamente 10 en sacarosa 20 % helada, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 por trituración y agitación en vórtex y se añadió EDTA pH 8,0 para una concentración final de 17 mM. Las células resuspendidas se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron como anteriormente. El sedimento resultante se resuspendió a DO 10 en agua helada por trituración y agitación en vórtex y se incubó en hielo durante 10 minutos.

5 Las células resuspendidas se centrifugaron después como anteriormente y el sobrenadante resultante (fracción periplásmica soluble) y sedimento celular (componentes periplásmicos insolubles y asociados a células) se analizaron por SDS-PAGE.

10 Se descubrió que el volumen de la rhGH sintetizada por BOB 132 era soluble y se localizaba en el periplasma. La proteína de rhGH periplásmica era indistinguible en tamaño de un patrón de hGH de tiroides purificada lo que indica que la secuencia señal stII se retiró durante la secreción de proteínas.

Ejemplo 3

15 Purificación y bioactividad de rhGH

A. Purificación de rhGH de tipo silvestre

20 Para purificar una cantidad significativa de rhGH de tipo silvestre, se indujo un cultivo de 330 ml de BOB132 (que expresaba stII-hGH), se cultivó durante una noche y se sometió a choque osmótico basándose en el procedimiento preparatorio descrito por Hsiung *et al.* (1986). Específicamente, se dejó crecer la cepa de *E.coli* W3110 que contenía el plásmido st-II hGH a 37 °C durante una noche en LB que contenía ampicilina 100 µg/ml. El cultivo de una noche saturado se diluyó a DO 0,03 a A₆₀₀ en 2 X 250 ml (500 ml de volumen total) de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se incubó a 37 °C en matraces de agitación de 2 l. Cuando la DO del cultivo alcanzó aproximadamente 0,4,

25 se añadió IPTG 100 mM para una concentración final de 0,5 mM para inducir expresión de las proteínas recombinantes. El cultivo inducido se incubó a 37 °C durante una noche (aproximadamente 16 horas). Los cultivos inducidos durante una noche alcanzaron una DO de aproximadamente 3,8 a A₆₀₀ y se centrifugaron usando una centrífuga Sorval RC-5 y un rotor GSA a 8.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Los sedimentos celulares se combinaron y resuspendieron a DO aproximadamente 47 en sacarosa al 20 % helada, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 por trituración y se añadió EDTA pH 8,0 para una concentración final de aproximadamente 25 mM. Las células resuspendidas se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron en una centrífuga IEC Centra MP4R con un rotor 854 a 8.500 rpm durante 7 minutos a 4 °C. Los sedimentos resultantes se resuspendieron a DO 47 en agua helada por trituración y agitación en vórtex y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células resuspendidas se centrifugaron en la centrífuga IEC como anteriormente y el sobrenadante resultante (fracción periplásmica soluble) y

30 sedimento celular (componentes asociados a células y periplásmicos insolubles) se analizaron por SDS-PAGE. De nuevo el gel mostró que la rhGH producida era soluble, periplásmica e indistinguible en tamaño del patrón de hGH de tiroides.

40 rhGH se purificó en un procedimiento de dos etapas basándose en el descrito por Becker y Hsiung (1986). El sobrenadante del choque osmótico se cargó en una columna de Pharmacia HiTrap Q Sepharose de 5 ml equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl 50-250 mM de 15 volúmenes de columna. Las fracciones de columna se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones 22-25 que eluyeron a una concentración salina de aproximadamente 100-125 mM se enriquecieron con respecto hGH y se agruparon, concentraron y fraccionaron adicionalmente en una columna de dimensionamiento Superdex 200 HR

45 10/30. Las fracciones 34-36 de la columna Superdex (que representan PM de aproximadamente 21-22 kDa basándose en el perfil de elución de los patrones de PM) contenían la mayoría del rhGH, se agruparon y se almacenaron como alícuotas congeladas a -80 °C. El rendimiento final de rhGH, según se determinó por absorbancia a 280 nM y usando un kit de ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad Laboratories), fue de aproximadamente 2 mg. La hGH de tiroides no reducida migra con un peso molecular aparente ligeramente menor que hGH de tiroides reducida cuando se analiza por SDS-PAGE. Este cambio de peso molecular es indicativo de formación de enlace disulfuro apropiado. La rhGH purificada de los inventores co-migró con hGH de tiroides en condiciones tanto reductoras como no reductoras lo que indica que la rhGH estaba plegada de forma apropiada y enlazada por disulfuro. Los datos presentados posteriormente indican que la actividad biológica de rhGH es indistinguible de la de hGH de tiroides.

55

B. Resultados de bioensayo para hGH y rhGH de tiroides

60 La línea celular FDC-P1 parental muestra una fuerte respuesta proliferativa a IL-3 de ratón, pero no a hGH de tiroides. En ausencia de IL-3, la mayoría de las células FDC-P1 mueren, dando valores de absorbancia menores de 0,2. Por el contrario, las células FDC-P1 transformadas con el receptor de hormona de crecimiento de conejo proliferan en respuesta a hGH de tiroides, como se demuestra por un aumento dependiente de dosis del número de células y los valores de absorbancia. La CE₅₀ (concentración de proteína requerida para conseguir la mitad de la estimulación máxima) para este efecto varió de 0,75 a 1,2 ng/ml de hGH de tiroides (0,03-0,05 nM) en diferentes experimentos, similar a lo que se ha indicado en la bibliografía (Rowlinson *et al.*, 1995). Una diferencia significativa

65 entre la línea parental FDC-P1 y las células FDC-P1 transformadas con el receptor de hormona de crecimiento de conejo es que las segundas células sobreviven en ausencia de IL-3 o hGH, dando como resultado valores de

absorbancia mayores (típicamente 0,6 – 1,1, dependiendo del ensayo y la duración de la incubación con MTS en los pocillos de control de factor de crecimiento cero). El grupo inicial de transformantes de receptor de hormona de crecimiento de conejo y las cinco uniones celulares de receptor de hormona de crecimiento independientes mostraron el mismo efecto. Se obtuvo un resultado similar con un segundo conjunto de transfectantes de receptor de hormona de crecimiento de conejo aislados de forma independiente. Rowlinson *et al.* (1995) observaron un efecto similar, lo que sugiere que la supervivencia independiente de IL-3/GH es una consecuencia del procedimiento de transformación. Aunque las líneas celulares del receptor de hormona del crecimiento no requirieron IL-3 o hGH para el crecimiento, aún mostraron una respuesta proliferativa robusta para IL-3 y hGH. El efecto práctico de los valores de absorbancia mayores en ausencia de hGH es reducir la “ventana” de la respuesta a hGH (la diferencia entre los valores de absorbancia máximos y mínimos). Esta ventana varía consistentemente de 40 a 70 % de los valores de factor de crecimiento cero, similar a lo que se indicó por Rowlinson *et al.* (1995).

GH de tiroides y rhGH de tipo silvestre preparados por los inventores tuvieron curvas de respuesta a dosis similares en el bioensayo variando las CE₅₀ de 0,6 a 1,2 ng/ml en diferentes experimentos (Tabla 1).

Tabla 1

Bioactividades de hGH y Mueñas de Cistina de hGH			
	Forma Ensayada	Media de CE ₅₀ (ng/ml)	Intervalo de CE ₅₀ (ng/ml) ¹
hGH de tiroides	Monómero	1 +/- 0,1 (N=11)	0,75 – 1,2
RhGH	Monómero	0,8 +/- 0,3 (N=3)	0,6, 0,8, 1,1
T3C	Dímero	1,4 +/- 0,6 (N=7)	0,75 – 2,5
S144C	Monómero	1,6 +/- 0,8 (N=5)	1,1, 1,1, 1,5, 2,2, 2,7
T148C-lotA	Monómero	0,5 (N=2)	0,4, 0,5
T148C-lotB	Monómero	2,5 +/- 1,0 (N=4)	1,5, 1,9, 3,1, 3,6
N/A, no aplicable			
¹ valores de CE ₅₀ de experimentos individuales. Se muestra un intervalo de CE ₅₀ cuando N>5.			

Ejemplo 4

20 Construcción de mueñas de cisteína de hGH

La mutación de sustitución de cisteína T135C se construyó como sigue. El oligonucleótido inverso mutagénico BB28 (5>CTGCTTGAAGATCTGCCCCACACCG GGGG CTGCCATC>3) (SEC ID N°: 10) se diseñó para cambiar el codón ACT para treonina en el resto aminoacídico 135 a un codón TGT que codifica cisteína y para abarcar el sitio *Bgl* II cercano. Este oligo se usó en PCR junto con BB34 (5>GTAGCGCAGGCCTTCCCAACC ATT>3) (SEC ID N°: 11) que hibrida con la región de unión del gen de fusión ompA-GH y no es mutagénico. La PCR se realizó en una reacción de 50 µl en tampón de PCR 1X (tampón Perkin-Elmer que contiene MgCl₂ 1,5 mM), concentración de 200 µM de cada uno de los cuatro nucleótidos dA, dC, dG y dT, con cada cebador oligonucleotídico presente a 0,5 µM, 5 pg de pBBT112 (descrito anteriormente) como molde y 1,25 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer) y 0,125 unidades de ADN polimerasa Pfu (Stratagene). Las reacciones se realizaron en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). El programa usado implicaba: 95 °C durante 3 minutos seguido de 25 ciclos de [95 °C durante 60 segundos, 45 °C, 50 °C o 55 °C durante 75 segundos, 72 °C durante 60 segundos] seguido de un mantenimiento a 6° C. Las reacciones de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa que mostró que las tres diferentes temperaturas de hibridación proporcionaban producto significativo del tamaño esperado: aproximadamente 430 pb. La reacción a 45 °C se “limpió” usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se digirió con *Bgl* II y *Pst* I. El fragmento de *Bgl* II - *Pst* I de 278 pb resultante, que incluye la mutación T135C potencial, se purificó en gel y se ligó en pBBT111, portando el derivado de pUC19 el gen de fusión stII-GH (descrito anteriormente) que se había digerido con *Bgl* II y *Pst* I y se había purificado en gel. Los transformantes de esta ligación se exploraron inicialmente por digestión con *Bgl* II y *Pst* I y posteriormente se secuenció un clon para confirmar la presencia de la mutación T135C y la ausencia de cualquier mutación adicional que pudiera introducirse potencialmente por la reacción de PCR o por los oligonucleótidos sintéticos. Se descubrió que el clon secuenciado tenía la secuencia correcta por todo el segmento *Bgl* II - *Pst* I.

La mutación de sustitución de S132C se construyó usando el protocolo descrito anteriormente para T135C con las siguientes diferencias: se usó oligonucleótido inverso mutagénico BB29 (5>CTGCTTGAAGATCTGCCCCAGTCCGGGGCAGCCATCTTC>3) (SEC ID N°: 12) en lugar de BB28 y se usó la reacción de PCR con temperatura de hibridación de 50 °C para clonación. Se descubrió que uno de dos clones secuenciados tenía la secuencia correcta.

La mutación de sustitución T148C se construyó usando un protocolo análogo pero empleando una estrategia de clonación diferente. Se usó el oligonucleótido directo mutagénico BB30 (5>GGGCAGATCTT CAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACTGCAACTCACACAAC>3) (SEC ID N°: 13) en PCR con el cebador inverso no mutagénico BB33 (5>CGCGGTACCCGGGATCCGATTAGAATCCACAGCT>3) (SEC ID N°: 14) que hibrida con el extremo más 3' de la secuencia codificante de GH y abarca el sitio *Bam* H1 inmediatamente cadena abajo. Se realizó PCR como se ha descrito anteriormente con la excepción de que las temperaturas de hibridación usadas fueron 46, 51 y 56 °C. Después de PCR y análisis en gel como se ha descrito anteriormente las reacciones de 46 y 51 °C se agruparon para clonación. Estas se digirieron con *Bam* H1 y *Bgl* II y el fragmento de 188 pb resultantes se purificó en gel y se clonó en pBBT111 que se había digerido con *Bam* H1 y *Bgl* II, se había tratado con fosfatasa alcalina de ternero (Promega) de acuerdo con los protocolos del proveedor y se había purificado en gel. Los transformantes de esta hibridación se analizaron por digestión con *Bam* H1 y *Bgl* II para identificar clones en los que el fragmento de PCR mutagénico de 188 pb *Bam* H1- *Bgl* II se clonó en la orientación apropiada: debido a que *Bam* H1 y *Bgl* II generan extremos compatibles, esta etapa de clonación no es específica de orientación. Se mostró que cinco de los seis clones ensayados se orientaron correctamente. Uno de estos se secuenció y se mostró que contenía la mutación T148C deseada. Se confirmó que la secuencia del resto del fragmento de PCR mutagénico *Bam* H1- *Bgl* II de 188 pb en este clon era correcta.

La construcción de la mutación de sustitución S 144C fue idéntica a la construcción de T148C con las siguientes excepciones. Se usó oligonucleótido directo mutagénico BB31 (5>GGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACTGCAAGTTCGAC>3) (SEC ID N°: 15) en lugar de BB30. Se mostró que dos de los seis clones ensayados estaban orientados correctamente. Uno de estos se secuenció y se mostró que contenía la mutación S144C deseada. También se confirmó que la secuencia del resto del fragmento de PCR mutagénico *Bam* H1- *Bgl* II de 188 pb en este clon era correcta.

También se construyó una mutación que añadió un resto de cisteína al extremo carboxi-terminal natural de GH. La construcción de esta mutación denominada stp192C, se llevó a cabo usando los procedimientos descritos anteriormente para construcción de la muteína T148C pero empleó diferentes cebadores oligonucleotídicos. El oligonucleótido inverso mutagénico BB32 (5>CGCGGTACCCGGATCCTTAGCAGAAGCCACAGCTGCCCTCCAC>3) (SEC ID N°: 16) que inserta un codón TGC para cisteína entre el codón para el resto phe carboxi-terminal de GH y el codón de parada de la traducción TAA y abarca el sitio *Bam* H1 cercano se usó junto con BB34 que se ha descrito anteriormente. Después de PCR y análisis en gel como se ha descrito anteriormente se usó la reacción a 46 °C para clonación. Se mostró que tres de los seis clones ensayados estaban correctamente orientados. Uno de estos se secuenció y se mostró que contenía la mutación stp192C deseada. La secuencia del resto del fragmento de PCR mutagénico *Bam* H1- *Bgl* II de 188 pb en este clon se confirmó como correcto.

La mutación de sustitución S100C se construyó usando oligonucleótido inverso mutagénico BB25 (5>GTCAGAGGCGCCGTACACCAGGCAGTTGGCGAAGAC>3) (SEC ID N°: 17) que altera el codón AGC para serina en el resto aminoacídico 100 a un codón TGC que codifica cisteína. BB25 también abarca el sitio *Nar* I cercano. Se llevaron a cabo reacciones de PCR que usaban BB25 y BB34 usando el protocolo de PCR descrito anteriormente para la construcción de la mutación T135C. Después del análisis en gel de los productos de PCR, el producto de la reacción de hibridación a 50 °C se limpió usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen), digerido con *Pst* I y *Nar* I. El fragmento de 178 pb resultante se purificó en gel y se ligó a pBBT111 que se había digerido con *Pst* I y *Nar* I y purificado en gel. Se exploraron plásmidos aislados de transformantes de esta ligación por digestión con *Pst* I y *Nar* I y posteriormente se secuenció un plásmido para confirmar la presencia de la mutación S100C y la ausencia de cualquier otra mutación en el segmento de 178 pb *Pst* I - *Nar* I.

La mutación de sustitución A98C se construyó usando el procedimiento descrito anteriormente para S100C con las siguientes diferencias: el oligonucleótido inverso mutagénico BB26 (5>GTCAG AGGCGCCGTACACCAGGCTGTTGCAGAAGACACTCCT>3) (SEC ID N°: 18) se usó para PCR en lugar de BB25 y la reacción de PCR realizada con una temperatura de hibridación de 45 °C se usó para clonación. Se secuenció un clon y se descubrió que tenía la secuencia correcta.

La mutación de sustitución A34C se construyó como sigue. El oligo inverso mutagénico BB23 (5>GCGCTGCAGGAATGAATACTTCTGTTCCCTTTGGGATATAGCATTCTTC AAACTC>3) (SEC ID N°: 19) se diseñó para cambiar el codón GCC para alanina en el resto aminoacídico 34 a un codón TGC que codifica cisteína y para abarcar el sitio *Pst* I. Este oligonucleótido se usó en reacciones de PCR junto con BB11 (5>CCCCTCTAGACAT ATGAAGAAGAACATCGCATTCTGCTGGCATCTATGTTTCGTTTTCTCTATCG>3) (SEC ID N°: 20) que hibrida con el extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia líder stII y abarca el sitio *Nde* I que solapa con el codón de metionina iniciador.

Se realizaron reacciones de PCR en 50 µl en tampón de PCR 1X (Promega) que contenía MgCl₂ 1,5 mM, concentración de 200 µM de cada uno de los cuatro nucleótidos dA, dC, dG y dT, con cada cebador oligonucleotídico presente a 0,2 µM, 1 ng de pBBT111 (descrito anteriormente) como molde y 0,8 unidades de ADN polimerasa Tac (Promega) y 0,33 unidades de ADN polimerasa Pfu (Stratagene). Se realizaron reacciones en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). El programa usado implicó: 96 °C durante 3 minutos seguido de 25 ciclos de [95 °C durante 60 segundos, 50 °C, 55 °C o 60 °C durante 75 segundos, 72 °C durante 60 segundos]

seguido de un mantenimiento a 6 °C. Las reacciones de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa que mostró que las tres temperaturas de hibridación diferentes proporcionaron producto significativo del tamaño esperado; aproximadamente 220 pb. Se agruparon las reacciones de 50 y 55 °C, se “limpiaron” usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se digirieron con *Nde* I y *Pst* I. El fragmento *Nde* I - *Pst* I de 207 pb resultante, que incluye la mutación potencial A34C, se purificó en gel y se ligó a pBBT111, que se había digerido con *Nde* I y *Pst* I, tratado con fosfatasa alcalina y purificado en gel. Los transformantes de esta ligación se exploraron inicialmente por digestión con *Nde* I y *Pst* I y posteriormente se secuenció un clon para confirmar la presencia de la mutación A34C y la ausencia de cualquier mutación adicional que podría potencialmente introducirse por la reacción de PCR o por los oligonucleótidos sintéticos. Se descubrió que el clon secuenciado tenía la secuencia correcta a lo largo del segmento *Nde* I - *Pst* I.

La mutación de sustitución S43C se construyó usando el protocolo descrito anteriormente para A34C con las siguientes diferencias: se usó oligonucleótido inverso mutagénico BB24 (5 >GCGCTG CAGGAAGCAATACTTCTGTTCCCTTGG>3) (SEC ID N°: 21) en lugar de HB23. Se secuenció un clon y se mostró que contenía la secuencia correcta.

La mutación de sustitución T3C se construyó usando dos etapas de PCR secuenciales. La primera etapa creó la mutación deseada mientras que la segunda etapa extendió el producto de PCR de la primera reacción para abarcar un sitio de clonación útil. El oligonucleótido directo mutagénico BB78 (5>GCAT CTATGTTTCGTTTTCTCTATCGCTACCAACGCT TACGCATTCCCATTCCCTTATCCAG>3) (SEC ID N°: 22) se diseñó para cambiar el codón ACC para treonina en el resto aminoacídico 3 a un codón TGC que codifica cisteína y para abarcar e hibridar con el punto de unión del gen de fusión stII – hGH. Se usó BB78 en la PCR de primera etapa junto con BB33 que se ha descrito anteriormente.

La primera reacción de PCR se realizó en 50 µl en tampón de PCR 1X (Promega) que contenía MgCl₂ 1,5 mM, concentración de 200 µM de cada uno de los cuatro nucleótidos dA, dC, dG y dT, cada cebador oligonucleotídico a 0,2 µM, 1 ng de pBBT111 (descrito anteriormente) como molde y 1,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Promega) y 0,25 unidades de ADN polimerasa Pfu (Stratagene). Las reacciones se realizaron en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). El programa usado implicó: 96 °C durante 3 minutos seguido de 25 ciclos de [94 °C durante 60 segundos, 60 °C durante 75 segundos, 72 °C durante 60 segundos] seguido de un mantenimiento a 6 °C. La reacción de PCR se precipitó con etanol y el producto de aproximadamente 630 pb se purificó en gel y se recuperó en 20 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5). Se diluyó una alícuota de este fragmento purificado en gel 100 veces y se usaron 2 µl del fragmento diluido como molde en la segunda etapa de PCR. La segunda etapa de PCR empleó los oligonucleótidos BB11 y BB33 (ambos descritos anteriormente) y usó las condiciones de reacción empleadas en la reacción de PCR de primera etapa. La reacción de PCR de segunda etapa se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se observó el fragmento de aproximadamente 670 pb esperado. La reacción de PCR se “limpió” usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se digirió con *Nde* I y *Pst* I. El fragmento *Nde* I - *Pst* I de 207 pb resultante, que incluye la mutación potencial T3C, se purificó en gel y se ligó en pBBT111, que se había digerido con *Nde* I y *Pst* I, tratado con fosfatasa alcalina y purificado en gel. Los transformantes de esta ligación se exploraron inicialmente por digestión con *Nde* I y *Pst* I y posteriormente se secuenció un clon para confirmar la presencia de la mutación T3C y la ausencia de cualquier mutación adicional que podría introducirse potencialmente por la reacción de PCR o por los oligonucleótidos sintéticos. Se descubrió que el clon secuenciado tenía la secuencia correcta a lo largo del segmento *Nde* I - *Pst* I.

La mutación de sustitución A105C se construyó usando la técnica de “mutagénesis por extensión de solapamiento” como se describe en general por Horton, R M. pág 251-261 en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications editado por White, B. A. (1993) Humana Press, Inc., Totowa, NJ. Con esta técnica se amplifican dos fragmentos separados del segmento de ADN diana como se representa en la Figura 1. Se produce un fragmento con cebadores a y b para producir producto AB. El Segundo par de cebadores, c y d, se usa para producir producto CD. Los cebadores b y c introducen el mismo cambio de secuencia en los extremos derecho e izquierdo de los productos AB y CD, respectivamente. Los productos AB y CD comparten un segmento de secuencia idéntica (mutada), el “solapamiento”, que permite la hibridación de la hebra superior de AB con la hebra inferior de CD y viceversa. La extensión de estos solapamientos hibridados por ADN polimerasa en una reacción de PCR posterior usando los cebadores a y d con productos AB y CD añadidos ambos como molde crea una molécula mutante de longitud completa AD.

Con la excepción del uso de diferentes cebadores oligonucleotídicos, las reacciones de PCR iniciales para la construcción A105C se realizaron de forma idéntica a las descritas en la construcción de T3C anterior. Los pares de cebadores usados fueron: (BB27 + BB33) y (BB11 + BB79). BB11 y BB33 se han descrito anteriormente. BB27 y BB79 son oligonucleótidos mutagénicos complementarios que cambian el codón de GCC para alanina en el resto aminoacídico 105 a un codón TGC que codifica cisteína. La secuencia de BB27 es (5>AGCCTGGTGTACGGCTGCTCTGACAGCAACGTC>3) (SEC ID N°: 23) y la secuencia de BB78 es 5>GACGTTGCTG TCAGAGCAGCCGTACACCAGGCT>3 (SEC ID N°: 24). Las reacciones de PCR (BB27 x BB33) y (BB11 x BB79) se precipitaron con etanol, se purificaron en gel y se recuperaron en 20 µl Tris-HCl 10 mM (pH 8,5). El gel preparatorio mostró que el producto predominante de cada reacción de PCR era del tamaño esperado:

- aproximadamente 290 pb para la reacción (BB27 x BB33) y aproximadamente 408 pb para la reacción (BB11 x BB79). Estos dos fragmentos mutagénicos se “cortaron y empalmaron” juntos en una reacción de PCR posterior. En esta reacción se añadió 1 µl de cada fragmento purificado en gel de las reacciones iniciales como molde y se usaron BB11 y BB33 como cebadores. Por lo demás, la reacción de PCR se realiza usando las mismas condiciones empleadas para las reacciones (BB27 x BB33) y (BB11 x BB79) iniciales. Se analizó una alícuota de la reacción de PCR secundaria por electroforesis en gel de agarosa y se observó la banda de aproximadamente 670 pb esperada. El volumen de la reacción de PCR se “limpió” después usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se digirió con *Bgl* II y *Pst* I. El fragmento *Bgl* II - *Pst* I de 276 pb resultante, que incluye la mutación potencial A105C, se purificó en gel y se ligó en pBBT111, que se había digerido con *Bgl* II y *Pst* I, y purificado en gel. Los transformantes de esta ligación se exploraron inicialmente por digestión con *Bgl* II y *Pst* I y posteriormente se secuenció un clon para confirmar la presencia de la mutación A105C y la ausencia de cualquier mutación adicional que pudiera introducirse potencialmente por la reacción de PCR o por los oligonucleótidos sintéticos. Se descubrió que el clon secuenciado tenía la secuencia correcta por todo el fragmento *Bgl* II - *Pst* I.
- Para expresión en *E. coli* como proteínas secretadas al espacio periplásmico, los genes de stII-hGH que codifican las 11 muteínas se escindieron de los derivados de pBBT111 basados en pUC19 como fragmentos *Nde* I - *Xba* I de aproximadamente 650 pb y se subclonaron en el vector de expresión pCYB1 que se había usado para expresar rhGH. Para experimentos de expresión, estos plásmidos se introdujeron en *E. coli* W3110.
- Usando procedimientos similares a los descritos en el presente documento y en el Ejemplo 23, pueden construirse otras muteínas de cisteína de GH. Las muteínas de cisteína pueden ser mutaciones de sustitución que sustituyen un resto aminoacídico natural por cisteína en la secuencia codificante de GH, mutaciones de inserción que insertan un resto de cisteína entre dos aminoácidos de origen natural en la secuencia codificante de GH o mutaciones de adición que añaden un resto de cisteína delante del primer aminoácido, F1, de la secuencia codificante de GH o añaden un resto de cisteína después del resto aminoacídico terminal, F191, de la secuencia codificante de GH. Los restos de cisteína pueden sustituir a cualquier aminoácido o insertarse entre dos aminoácidos cualesquiera, en cualquier lugar en la secuencia codificante de GH. Los sitios preferidos para sustitución o inserción de restos de cisteína en GH están en la región que precede a la hélice A, el bucle A-B, el bucle B-C, el bucle C-D y la región distal a la hélice D. Otros sitios preferidos son los primeros o últimos tres aminoácidos de las hélices A, B, C y D. Son restos preferidos en estas regiones para crear sustituciones de cisteína F1, P2, P5, E33, K38, E39, Q40, Q46, N47, P48, Q49, T50, S51, S55, 557, T60, Q69, N72, N99, L101, V102, Y103, G104, S106, E129, D130, G131, P133, R134, G136, Q137, K140, Q141, T142, Y143, K145, D147, N149, S150, H151, N152, D153, S184, E186, G187, S188 y G190. También pueden insertarse restos de cisteína inmediatamente antes o después de estos aminoácidos. Un sitio preferido para añadir un resto de cisteína sería antes de F1, que se denomina en el presente documento * - 1C.
- También pueden construirse muteínas de GH que contienen una cisteína libre sustituyendo con otro aminoácido uno de los restos de cisteína de origen natural en GH. El resto de cisteína de origen natural que normalmente forma un enlace disulfuro con el resto de cisteína sustituido está ahora libre. El resto de cisteína no esencial puede reemplazarse con cualquiera de los otros 19 aminoácidos, pero preferiblemente con un resto de serina o alanina. Puede introducirse también un resto de cisteína libre en GH por modificación química de un aminoácido de origen natural usando procedimientos tales como los descritos en Sytkowski *et al.* (1998).

- Usando procedimientos similares a los descritos en los Ejemplos 1 - 15, pueden expresarse las proteínas en células procariotas tales como *E. coli*, purificar las proteínas, pegar las proteínas y medir sus bioactividades en un bioensayo *in vitro*. Las muteínas de GH también pueden expresarse en células eucariotas tales como células de insecto o de mamífero usando procedimientos similares a los descritos en los Ejemplos 16 - 19 o procedimientos relacionados bien conocidos para los expertos en la materia. Si se desea secreción, puede usarse la secuencia señal de GH natural, u otra secuencia señal, para secretar la proteína de células eucariotas.

Ejemplo 5

La adición de cistina mejora la recuperación de la muteína de cisteína T3C

- Se cultivó la cepa de *E. coli* W3110 que contenía la mutación T3 C durante una noche en 3 ml de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml. El cultivo de una noche saturado se diluyó a DO 0,03 a A₆₀₀ en 300 ml de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se incubó a 37 °C en matraces de agitación de 2 l. Cuando la DO de cultivo alcanzó 0,420 se añadió 1,5 ml de IPTG 100 mM para una concentración final de 0,5 mM para inducir expresión de la proteína recombinante. El cultivo inducido se incubó a 37 °C durante una noche (aproximadamente 16 horas).
- El cultivo de una noche inducido alcanzó una DO de 3,6 a A₆₀₀ y se separó en 2 volúmenes de 135 ml y se centrifugó usando una centrífuga Sorval RC-5 con un rotor GSA a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos celulares se sometieron a tratamiento de choque osmótico como sigue. Los sedimentos celulares se resuspendieron a DO aproximadamente 49 en 10 ml de tampón A helado [sacarosa 20 %, Tris-HCl 10 mM pH 7,5] o tampón B [sacarosa 120 %, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, cistina 5,5 mM (pH ajustado a 7,5-8,0)]. Los sedimentos se resuspendieron por trituración y agitación en vórtex y se añadió 1 ml de

EDTA 0,25 M pH 8,0 para proporcionar una concentración final de aproximadamente 25 mM. Las células resuspendidas se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron en un rotor SS-34 a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se resuspendieron por trituración y agitación en vórtex en 10 ml de tampón C helado [Tris-HCl 5 mM pH 7,5] o tampón D [Tris-HCl 5 mM pH 7,5, cistina 5 mM (pH ajustado a 7,5-8,0)] y se incubaron en hielo durante 30 minutos. El sedimento celular resuspendido se centrifugó en un rotor SS-34 a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante (fracción periplásmica soluble) se recuperó y se almacenó a -80 °C. El análisis de SDS-PAGE de los diversos sobrenadantes reveló que incorporando cistina en el procedimiento de choque osmótico, la cantidad de especie hGH monomérica recuperada en la fracción periplásmica soluble puede mejorarse significativamente. En la muestra tratada con cistina, los inventores observaron que una mayoría de la hGH aparecía como una banda sencilla de aproximadamente 22 kDa en un gel de SDS-PAGE no reducido y esa banda migraba conjuntamente con hGH de tiroides. En ausencia de cistina, se observaron varias especies de diferente peso molecular en el intervalo monomérico. Son visible agregados proteicos de mayor peso molecular cuando el gel se desarrolla usando transferencia de Western.

15 Ejemplo 6

Método general para expresión y purificación de variantes con cisteína añadida de GH

Un protocolo convencional para aislamiento de las muteínas de cisteína de hGH es como sigue. Se dejaron crecer cultivos de cepas de *E. coli* W3110 que contenían los plásmidos de muteína stII-hGH a saturación en LB que contenía ampicilina 100 µg/ml a 37 °C. Los cultivos de una noche se diluyeron típicamente a DO 0,025-0,030 a A₆₀₀ en LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se dejaron crecer a 37 °C en matraces de agitación. Cuando la DO del cultivo alcanzó 0,300-0,500 a A₆₀₀, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir expresión. Los cultivos inducidos se incubaron a 37 °C durante una noche. Los cultivos de una noche inducidos se sedimentaron por centrifugación en una centrífuga Sorval RC-5 a 8.000-10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y los sedimentos resultantes se sometieron a choque osmótico basándose en los procedimientos de Koshly y Botstein (1980) o Hsiung *et al.*, (1986) dependiendo del tamaño del cultivo. Para choque osmótico, los sedimentos celulares se resuspendieron a DO 25-50 en sacarosa 20 %, Tris-HCl 10 mM pH 7,5. En ciertos casos se incluyó EDTA 5 o 25 mM pH 8,0 y/o cistina 5 mM (pH ajustado a 7,5-8,0) en el tampón de resuspensión. Los sedimentos resuspendidos se incubaron en hielo durante 15-30 minutos y se centrifugaron como anteriormente. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se resuspendieron a DO 25-50 a A₆₀₀ en Tris-HCl 5 o 10 mM pH 7,5. En ciertos casos se incluyó EDTA 5 mM pH 8,0 y/o cistina 5 mM (pH ajustado a 7,5-8,0) en el tampón de resuspensión. Los sedimentos resuspendidos se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron como anteriormente. El sobrenadante resultante contiene los componentes periplásmicos solubles y el sedimento está comprendido por componentes periplásmicos insolubles y asociados a células.

La adición de cistina al tampón de choque osmótico dio como resultado recuperaciones significativamente mejoradas y estabilización de muchas de las muteínas de cisteína. En presencia de cistina las muteínas de cisteína eran principalmente monoméricas, mientras que en ausencia de cistina, se observó una mezcla de monómeros, dímeros y agregados de mayor orden de hGH, cuando las muestras se analizaron por SDS-PAGE no reductor y transferencias de Western. Supuestamente los agregados de mayor orden son una consecuencia de los restos de cisteína añadidos en las proteínas puesto que se redujeron en gran medida o estaban ausentes con rhGH de tipo silvestre. La adición de cistina al tampón de choque osmótico resolvió en gran medida este problema. Los inventores creen que la cistina reacciona con el resto de cisteína libre en las muteínas para formar un disulfuro mezclado estable, evitando de este modo la redistribución y agregación de disulfuro. Los inventores han ensayado también un segundo ditiol, cistamina y han visto un efecto estabilizador similar en muteínas de cisteína de hGH. Supuestamente otros ditiolos tales como glutatión oxidado también conducirían a recuperaciones mejoradas de proteínas que contengan una cisteína libre.

De las 11 muteínas de hGH analizadas, seis se expresaron a niveles suficientes para aislamiento y purificación. El análisis de SDS-PAGE no reducido de los sobrenadantes de choque osmótico para las muteínas A34C, S43C, A98C, S100C y S132C mostró poca o ninguna presencia de proteínas en el peso molecular correcto. La adición de cistina no mejoró de forma discernible la recuperación de estas proteínas. Los niveles de expresión relativamente bajos de estas muteínas hace difícil observar rendimientos mejorados. Los análisis preliminares de lisados de células completas indicaron que estas proteínas mutantes se expresaban, pero eran insolubles. Las muteínas T3C, A105C, T135C, S144C, T148C y stp192C mostraron niveles de expresión de moderados a buenos. Cinco de estas muteínas de cisteína (T3C, T135C, S144C, T148C y stp192C) mostraron recuperaciones significativamente mejoradas cuando estaba presente cistina en el tampón de choque osmótico. No se ensayó A105C en ausencia de cistina. Se describen protocolos de purificación de proteínas generales a continuación.

Se purificó WT-rhGH por intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel. Las muteínas de cisteína se purificaron por una mezcla de procedimientos cromatográficos incluyendo intercambio iónico, interacción hidrófoba (HIC), cromatografías de afinidad de quelación metálica (IMAC), Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC) o una combinación de estas técnicas. Generalmente, la muteína de hGH se capturó del sobrenadante de choque osmótico fresco usando una resina de flujo rápido de Q-Sepharose (Pharmacia) equilibrada en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. La columna se lavó con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente salino

creciente lineal de 10 volúmenes de NaCl de 0 a 250 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Se identificaron fracciones que contenían las muteínas de hGH por SDS-PAGE y transferencia de Western. Estas fracciones se agruparon y se almacenaron congeladas. Pueden usarse resinas alternativas para capturar muteínas de hGH de la mezcla de choque osmótico. Éstas incluyen HIC, resinas de intercambio iónico catiónico o resinas de afinidad.

5 Para cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), el grupo de columna Q se descongeló a temperatura ambiente y se añadió NaCl a una concentración final de 2 M. El grupo se cargó en la resina de flujo rápido de Butil-Sepharose previamente equilibrada en NaCl 2 M, fosfato sódico 20 mM, pH 7,5. Las muteínas de hGH se eluyeron de la resina usando un gradiente salino inverso de NaCl de 2 M a 0 M en fosfato 20 mM, pH 7,5. Las fracciones que contenían las muteínas de hGH se identificaron por SDS-PAGE y transferencia de Western y se agruparon.

15 En algunos casos, el grupo de HIC se cargó posteriormente directamente en una resina quelante de níquel (Qiagen) equilibrada en fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. Después de una etapa de lavado, las muteínas se recuperaron usando un gradiente de imidazol 0 – 30 mM en fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. hGH tiene una alta afinidad por el níquel, supuestamente a través del sitio de unión a metal divalente formado por H18, H21 y E174. Como resultado, puede obtenerse hGH en forma altamente pura usando una columna de quelación metálica (Maisano *et al.*, 1989). Todas las muteínas ensayadas se unieron estrechamente a la columna de níquel y se eluyeron a concentraciones de imidazol similares (aproximadamente 15 mM) a la rhGH de tipo silvestre.

20 Ejemplo 7

Purificación de T3C

25 La fracción periplásmica soluble preparada en presencia de cistina (Ejemplo 5) se cargó en una columna HiTrap de Q-Sepharose de 1 ml (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de NaCl 0-250 mM. La carga de columna y las fracciones recuperadas se analizaron por SDS-PAGE 14 %. T3C se eluyó a una concentración salina de aproximadamente 170-200 mM que fue significativamente posterior a WT-hGH. Sorprendentemente, la muteína T3C estaba presente en una forma monomérica cuando se cargó en la columna, pero se recuperó predominantemente como un homodímero enlazado por disulfuro estable después de elución de la columna Q. Cuando se redujo, la muteína T3C migró conjuntamente en un gel SDS-PAGE con hGH de tipo silvestre. Se produjo formación de dímero durante la etapa de purificación de columna Q. La cistina no estaba presente en el tampón de columna Q o los tampones usados para las otras etapas de columna. El dímero T3C permaneció intacto a lo largo de cualquier procedimiento adicional de concentración o purificación. El grupo de la columna Q se ajustó a una concentración de NaCl de 0,5 M y se cargó en columna de Ni-agarosa de 1 ml (Qiagen) equilibrada previamente en fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. Después de una etapa de lavado, se recuperaron dímeros T3C altamente purificados usando un gradiente de imidazol 0 – 30 mM en fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. Los dímeros de T3C estaban activos en el bioensayo (Ejemplo 10 y Tabla 1).

40 También se recuperaron las muteínas A105C, T135C y stp192C de la columna Q como dímeros enlazados por disulfuro. Parece que ciertas muteínas son capaces de formar dímeros enlazados por disulfuro estables, supuestamente a través del resto de cisteína añadido, una vez que se ha reiterado la cistina. Los inventores creen que podrían estabilizarse formas monoméricas de estas proteínas incluyendo cistina u otros compuestos de ditiol y/o agentes de bloqueo de cisteína en todos los tampones de columna y/o manteniendo el pH de los tampones por debajo de 7 para evitar el reordenamiento de disulfuro.

Ejemplo 8

Purificación de T148C

50 Se cultivó cepa de *E. coli* W3110 que expresaba la muteína T148C durante una noche en 3 ml de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml. El cultivo de una noche saturado se diluyó a DO 0,025 a A₆₀₀ en 500 ml de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml, se dividió en 2 volúmenes de 250 ml y se incubó a 37 °C en matraces de agitación de 2 l. Cuando la DO de cultivo alcanzó aproximadamente 0,35, se añadió 1,25 ml de IPTG 100 mM a cada matraz para una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante. El cultivo inducido se incubó a 37 °C durante una noche (~16 h).

60 Los cultivos de una noche inducidos alcanzaron una DO de aproximadamente 3,5 a A₆₀₀ y se centrifugaron usando una centrífuga Sorval RC-5 con un rotor GSA a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos celulares se sometieron a tratamiento de choque osmótico como sigue. Los sedimentos celulares se resuspendieron a DO aproximadamente 43 en sacarosa helada al 20 %, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 5,0 mM pH 8,0, cistina 5,0 mM (pH ajustado a 7,5-8,0) por trituración y agitación en vórtex. Las células resuspendidas se incubaron en hielo durante 15 minutos, se centrifugaron en una centrífuga Sorval con un rotor SS-34 a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se resuspendieron a DO aproximadamente 43 en Tris-HCl 1 mM helado pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8,0, cistina 5 mM (pH ajustado a 7,5-8,0) por trituración y agitación en vórtex. Las células resuspendidas se incubaron en hielo durante 30 minutos y se

centrifugaron en un rotor SS-34 a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante (fracción periplásmica soluble) se recuperó y se almacenó a -80 °C.

5 Se preparó un segundo cultivo de T148C de una manera similar con las siguientes excepciones: 1) el volumen de cultivo inducido fue de 200 ml y alcanzó una DO de aproximadamente 4,0 a A_{600} después de incubación durante una noche a 37 °C y 2) las resuspensiones de sedimento celular se realizaron a DO aproximadamente 30 a A_{600} .

10 La fracción periplásmica soluble de las preparaciones anteriores se combinó y se dializó frente a 1 l de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 durante una noche a 4 °C. El concentrado de diálisis se cargó en una columna de Q-Sepharose HiTrap de 5 ml (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de NaCl 0-250 mM. Las fracciones de columna se analizaron por SDS-PAGE 14 % (Novex, San Diego, CA). La muteína T148C eluyó como un pico agudo a una concentración salina de aproximadamente 60-80 mM. Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron en concentradores Centricon 10 (Amicon, Inc., Beverly, MA). El grupo concentrado se purificó adicionalmente en una columna Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada en fosfato sódico 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. Las fracciones de columna se analizaron de nuevo por SDS-PAGE y se agruparon las fracciones que contenían la muteína T148C. Los inventores observaron que la T148C permanecía monomérica después de recuperación de la columna de Q-Sepharose y eluía de la columna de Superdex a un peso molecular similar a hGH de tipo silvestre. La T148C preparada por Q-Sepharose y cromatografía de exclusión de tamaño se denomina Lote A.

20 Como alternativa, el grupo Q puede cargarse directamente en una resina quelante de níquel (Qiagen) equilibrada en fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. Después de una etapa de lavado, se recuperó T148C usando un gradiente de imidazol 0 – 30 mM en fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5. La proteína T148C preparada por Q-Sepharose y cromatografía de afinidad de níquel se denomina Lote B.

30 Se preparó un sobrenadante T148C de choque osmótico en ausencia de cistina y se intentó purificación sobre una columna Q-Sepharose. Se siguió el protocolo idéntico como se ha descrito anteriormente excepto que la cistina estaba ausente de los tampones de choque osmótico. El producto proteico de T148C se eluyó de la columna Q sobre un amplio intervalo de concentraciones salinas, las recuperaciones fueron menores y la preparación proteica fue sustancialmente menos pura que la muestra de T148C tratada con cistina.

Ejemplo 9

35 Purificación de S144C

Se cultivó cepa de *E. coli* W3110 que contenía la mutación S 144C durante una noche en 3 ml de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml. El cultivo de una noche saturado se diluyó a DO 0,03 a A_{600} en 250 ml de LB que contenía ampicilina 100 µg/ml y se incubó a 37 °C en un matraz de agitación de 2 l. Cuando la DO de cultivo alcanzó aproximadamente 0,3, se añadieron 1,25 ml de IPTG 100 mM para una concentración final de 0,5 mM para inducir expresión de la proteína recombinante. El cultivo inducido se incubó a 37 °C durante una noche (~16 h).

45 El cultivo de una noche inducido alcanzó una DO de aproximadamente 3,3 a A_{600} y se centrifugó usando una centrífuga Sorval RC-5 con un rotor GSA a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se sometió a tratamiento de choque osmótico como sigue. El sedimento celular se resuspendió a DO aproximadamente 33 en sacarosa 20 % helada, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, cistina 5,0 mM (pH ajustado a 7,5-8,0) por trituración y agitación en vórtex y se añadió EDTA 0,25 M pH 8,0 a una concentración final de 35 M. Las células resuspendidas se incubaron en hielo durante 30 minutos, se centrifugaron en la centrífuga Sorval con un rotor SS-34 a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se resuspendieron a DO aproximadamente 33 en Tris-HCl 5 mM helado pH 7,5, cistina 5 mM (pH ajustado a 7,5-8,0) por trituración y agitación en vórtex. Las células resuspendidas se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron en un rotor SS-34 a 8.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante (fracción periplásmica soluble) se recuperó y almacenó a -80 °C.

55 La fracción periplásmica soluble de la preparación anterior se cargó en una columna de Q-Sepharose HiTrap de 5 ml (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada en Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de NaCl 0-250 mM. Las fracciones de columna se analizaron por SDS-PAGE 14 % (Novex, San Diego, CA) y las fracciones que contenían muteína S144C, NaCl 125-150 mM se agruparon y congelaron. La muteína S144C era monomérica.

60 Ejemplo 10

Bioactividades de muteínas de cisteína de hGH

65 Las actividades biológicas de las muteínas de cisteína T3C, S144C y T148C purificadas se midieron usando el ensayo de proliferación celular descrito en el Ejemplo 1. Las concentraciones proteicas se determinaron usando un

ensayo de Bradford. Las tres muteínas eran biológicamente activas. Todas las muteínas alcanzaron el mismo nivel de estimulación máxima que hGH de tiroides, dentro del error del ensayo. Las CE_{50} medias para las muteínas T3C, S144C y T148C fueron similares a las de hGH y rhGH de tiroides (Tabla 1). Se han ensayado dos preparaciones independientes de la muteína T148C y una preparación de cada una de las muteínas S144C y T3C (todas preparadas en presencia de cistina) múltiples veces (Tabla 1). Las muteínas A105C, T135C y stp192C parcialmente purificadas también se han ensayado y son biológicamente activas.

Ejemplo 11

10 Métodos generales para pegilación y purificación de muteínas de cisteína

Las muteínas de GH pueden pegilarse usando una diversidad de reactivos de PEG-maleimida (o PEG-vinilsulfona) sensibles a cisteína que están disponibles en el mercado. Generalmente, los métodos para pegilar las proteínas con estos reactivos serán similares a los descritos en el documento WO 9412219 (Cox y McDermott) y el documento WO 9422466 (Cox y Russell), con modificaciones pequeñas. Las proteínas recombinantes generalmente se reducen parcialmente con ditioneitol (DTT), Tris (2-carboxietil) fosfina-HCl (TCEP) o algún otro agente reductor para conseguir pegilación óptima de la cisteína libre. La cisteína libre es relativamente no reactiva a PEG sensibles a cisteína a no ser que se realice esta etapa de reducción parcial. La cantidad de agente reductor requerido para reducir parcialmente cada muteína puede determinarse de forma empírica, usando una serie de concentraciones de agente reductor a diferentes pH y temperaturas. Las concentraciones del agente reductor típicamente varían de 0,5 equivalente molar a un exceso de 10 veces. Las temperaturas preferidas son de 4 °C a 37 °C. El pH puede variar de 6,5 a 9,0 pero es preferiblemente de 7,5 a 8,5. Las condiciones óptimas también variarán dependiendo del reductor y el tiempo de exposición. En las condiciones apropiadas, los disulfuros menos estables (típicamente disulfuros intermoleculares y disulfuros mezclados) se rompen primero en lugar de los disulfuros nativos más termodinámicamente estables. Típicamente, un exceso molar de 5-10 veces de DTT durante 30 minutos a temperatura ambiente es eficaz. Puede detectarse reducción parcial por un desplazamiento ligero del perfil de elución de la proteína de una columna de fase inversa. En el caso de una hGH dimerica, un desplazamiento del peso molecular es visible por ciclo de análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Debe tenerse cuidado de no reducir excesivamente la proteína y exponer restos de cisteína adicionales. La reducción excesiva puede detectarse por HPLC de fase inversa (la proteína excesivamente reducida tendrá un tiempo de retención similar a la proteína completamente reducida y desnaturalizada) y por la aparición de moléculas de GH que contienen dos PEG después de la reacción de pegilación (detectable por un cambio de peso molecular en SDS-PAGE). GH de tipo silvestre puede actuar como un control puesto que no debería pegilarse en condiciones que no reduzcan los disulfuros intramoleculares nativos. Puede retirarse agente reductor en exceso antes de pegilación por cromatografía de exclusión de tamaño o por diálisis. No es necesario retirar TCEP antes de la adición del reactivo de pegilación puesto que no contiene un grupo de tiol libre. La proteína parcialmente reducida puede reaccionar con diversas concentraciones de PEG-maleimida o PEG-vinilsulfona (típicamente relaciones molares de PEG: proteína de 1:1, 5:1, 10:1 y 50:1) para determinar la relación óptima de los dos reactivos. La pegilación de la proteína puede controlarse por un desplazamiento de peso molecular, por ejemplo, usando SDS-PAGE. La cantidad más baja de PEG que proporciona cantidades significativas de producto mono-pegilado sin proporcionar producto di-pegilado se considera típicamente óptima (80 % de conversión a producto mono-pegilado se considera generalmente bueno). Generalmente, la proteína mono-pegilada puede purificarse de proteína no pegilada y PEG que no ha reaccionado por cromatografía de exclusión de tamaño, de intercambio iónico, de afinidad, de fase inversa o de interacción hidrófoba. Pueden usarse otros protocolos de purificación tales como extracción orgánica de 2 fases o precipitación salina. La proteína pegilada purificada puede ensayarse en el ensayo de proliferación celular descrito en el Ejemplo 1 para determinar su actividad específica.

Pueden realizarse experimentos para confirmar que la molécula de PEG está unida a la proteína en el sitio apropiado. Esto puede conseguirse por digestión química o proteolítica de la proteína, purificación del péptido pegilado (que tendrá un gran peso molecular) por cromatografía de exclusión de tamaño, de intercambio iónico o de fase inversa, seguido de secuenciación de aminoácidos. El aminoácido acoplado a PEG aparecerá como un blanco en la ejecución de secuenciación de aminoácidos.

Ejemplo 12

55 Preparación y purificación de PEG-T3C

Se realizó un estudio de titulación preliminar para determinar concentraciones de agente reductor y reactivo de PEG apropiadas y para evitar la reducción excesiva de la proteína. Los inventores controlaron la reducción parcial de la proteína por conversión de especie dímera a monómera no reducida en SDS-PAGE no reducido. Se incubaron alícuotas de un μg de dímero T3C purificado con concentraciones crecientes de TCEP durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se analizaron inmediatamente por SDS-PAGE no reductor. La cantidad de TCEP que produjo cantidades significativas de monómeros de T3 C sin reducir excesivamente y desnaturalizar la proteína se usó para experimentos posteriores. TCEP es un agente reductor conveniente para experimentos a pequeña escala porque no interfiere con la reacción de pegilación; por lo tanto la mezcla de proteína: TCEP no tuvo que dializarse antes de la adición de PEG. A una escala mayor se prefieren agentes reductores baratos tales como

DTT para reducir proteínas. Generalmente, la proteína se trata con un agente reductor durante una cantidad de tiempo óptima. El pH de la reacción se ajusta después a 6,5 o por debajo para limitar las reordenaciones de disulfuro. El agente reductor se retira por diálisis o cromatografía líquida. El pH se reajusta después a más de 6,5 o preferiblemente 7,5 a 8,5 y se añade el reactivo de PEG.

5 Los experimentos de titulación a pH 7,5 indicaron que un exceso molar de cinco veces de TCEP durante 60 minutos a temperatura ambiente convertía la mayoría de la especie de dímero de T3C en monómero enlazado por disulfuro de forma apropiada sin reducir excesivamente la proteína. Los experimentos de control indicaron que, como se esperaba, el dímero de T3C necesitaba reducirse con TCEP para pegilarse. Estas condiciones de reacción se
10 cambiaron de escala después a una escala de reacción de 100 µg. Se añadió un exceso molar de 10 veces de maleimida-PEG de 5 kDa (Fluka) a la mezcla de T3C:TCEP después de 10 minutos y se permitió que la reacción de pegilación continuara durante 60 minutos a temperatura ambiente. La muestra se cargó rápidamente en una columna de Q-Sepharose de 1 ml equilibrada en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. La columna se lavó con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente salino creciente lineal de 10 volúmenes de NaCl 0 a 250
15 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Las fracciones que contenían T3C mono-pegilado (una molécula de PEG sencilla unida al monómero de T3C) se identificaron por SDS-PAGE y transferencia de Western. Estas fracciones se agruparon y se almacenaron congeladas. La presencia del resto de PEG reduce la afinidad de la proteína por la resina, permitiendo que la proteína pegilada se separe de la proteína no pegilada.

20 **Ejemplo 13**

Pegilación de S144C y otras muteínas de cisteína

Se realizó también un estudio de titulación preliminar para S144C para determinar concentraciones de agente reductor, reactivo de PEG apropiadas y para evitar la reducción excesiva de la proteína como se ha descrito en el
25 Ejemplo 12 para T3C. La pegilación a mayor escala se llevó a cabo a pH 7,5 a temperatura ambiente durante 2 h usando un exceso molar de 2 veces de TCEP y un exceso molar de 10 veces de maleimida-PEG de 5 kDa. El análisis de SDS-PAGE de la mezcla de reacción mostró algunas especies con dos o más PEG presentes. Éstas se separaron de la S144C mono-pegilada usando una columna de Q-Sepharose como se ha descrito en el Ejemplo 12.
30 Los inventores realizaron de forma separada una reacción de pegilación usando vinilsulfona-PEG 5 kDa (Fluka) que dio como resultado S144C monopegilada en condiciones reductoras idénticas.

Los inventores también realizaron reacciones de pegilación a pequeña escala en T148C, stp192C y T135C, todas las cuales produjeron proteína mono-pegilada con maleimida-PEG 5 kDa y/o vinilsulfona-PEG 5 kDa.

35 **Ejemplo 14**

Bioactividad de las Proteínas de hGH PEG-T3C y PEG-S144C

40 La actividad biológica de las proteínas PEG-T3C y PEG-S144C se midió en el ensayo de proliferación celular (Ejemplo 1). La proteína PEG-T3C mostró una curva de respuesta a dosis similar a hGH de tiroides y proteína T3C no pegilada y alcanzó el mismo nivel de estimulación máxima. El valor de CE₅₀ medio para PEG-T3C fue de 1,6 ng/ml (0,07 mM) (valores de 1,3, 1,5, 1,7, 1,8 ng/ml en cuatro experimentos). La bioactividad de la proteína PEG-T3C es al menos 100 veces mayor que la de rhGH que se ha pegilado usando reactivos de NHS-PEG no
45 específicos (CE₅₀ de 440 ng/ml (20 nM)) como se describe en Clark *et al.*, (1996).

El valor de CE₅₀ medio para PEG-S144C fue de 43 ng/ml (2 nM) (40 y 50 ng/ml en dos experimentos). La bioactividad de la proteína PEG-S144C es aproximadamente 10 veces mayor que la de rhGH que se ha pegilado usando reactivos de NHS-PEG no específicos (CE₅₀ de 440 ng/ml (20 nM); Clark *et al.*, 1996).

50 **Ejemplo 15 (no es parte de la invención)**

Construcción de trímeros enlazados por disulfuro y

55 multímeros de mayor orden ligados a disulfuro de hGH

Podrían construirse variantes de hGH adicionales que tengan más de una cisteína "libre" y usarse para crear multímeros ligados a disulfuro de mayor orden de hGH. Estos multímeros podrían incluir trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros y cualquier multímero de mayor orden. Por ejemplo, podría
60 construirse una variante de hGH que tuviera dos restos de cisteína "libres" usando tecnología de ADN recombinante para recombinar vectores plasmídicos de ADN *in vitro* que porten mutaciones de cisteína "libre" individuales. Como alternativa, la mutagénesis de una variante de cisteína de hGH podría emplearse para añadir una mutación de cisteína "libre" adicional. Podrían usarse versiones adicionales de cualquiera estos dos procedimientos para construir variantes de hGH que tengan tres o más cisteínas "libres".

65 Podría usarse una variante de hGH que tenga dos restos de cisteína libres para generar trímeros de hGH y

multímeros de mayor orden como sigue. Una variante tal se expresaría en *E. coli* y se recuperaría como un monómero en el sobrenadante de un lisado de choque osmótico como se desvela en los Ejemplos 5 – 9 en el presente documento. Podrían emplearse después etapas de procesamiento posteriores para inducir formación de enlace disulfuro, por ejemplo, cromatografía de Q Sepharose como se ha descrito en los Ejemplos 6 – 9 en el presente documento. En tales condiciones algunas variantes de hGH que tienen una cisteína libre, tales como T3C y stp192C, se convierten virtualmente cuantitativamente a dímeros enlazados por disulfuro. En las mismas o similares condiciones la formación de disulfuro intermolecular por una variante de hGH que tenga dos cisteínas libres, por ejemplo un mutante doble que combine T3C y stp192C, daría como resultado una polimerización de moléculas de hGH y la longitud de cadena de tales polímeros sería en principio ilimitada. La longitud de cadena podría limitarse y en cierto grado controlarse mediante la adición a la reacción de polimerización de moléculas de hGH que tengan solamente una cisteína libre tales como la variante T3C y/o la variante stp192C. La formación de enlaces disulfuro entre el polímero creciente y una molécula que tenga solamente una cisteína libre “protegerá” o evitará extensión adicional de uno de los dos sitios de polimerización en el polímero naciente. Una reacción posterior de una segunda molécula de hGH que tenga solamente una cisteína libre con el otro sitio de polimerización de ese polímero naciente termina la polimerización y fija la longitud de esa molécula polimérica. La longitud polimérica media podría controlarse por la estequiometría de los reactivos, es decir, la relación de moléculas de hGH con dos cisteínas libres con moléculas de hGH con una cisteína libre. Los polímeros medios más cortos se favorecerían por relaciones más bajas y los polímeros medios más largos se favorecerían por relaciones más altas. Podrían construirse polímeros “ramificados” más complejos de reacciones que implican variantes de hGH con 3 o más cisteínas libres con variantes de hGH que tengan solamente una cisteína libre.

Podrían purificarse posteriormente clases de tamaños concretos de ciertos polímeros por métodos cromatográficos tales como cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y similares. Podrían usarse procedimientos similares a los descritos para GH para crear dímeros enlazados por disulfuro y multímeros de mayor orden de EPO e interferón alfa.

Ejemplo 16

30 Clonación, expresión y purificación de eritropoyetina humana recombinante (rEPO) expresada en baculovirus (BV)

A. Clonación de un ADNc que codifica EPO. Se clonó un ADNc que codificaba EPO humana por PCR usando cebador directo BB45 (5' > CCCGGAT CCATGGGGGTGCACGAATGTCCTG >3) (SEC ID N° 25) y cebador inverso BB47 (5' > CCCGAATTCTATGCCAGGTGGACACACCTG >3) (SEC ID N° 26). BB45 hibrida con la secuencia de ADN que codifica la metionina iniciadora y la parte amino terminal de la secuencia señal de EPO y contiene un sitio *Bam* HI para fines de clonación (Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985). BB47 hibrida con la región no traducida 3' del ARNm de EPO inmediatamente cadena abajo de la señal de parada traduccional y contiene un sitio de restricción *Eco* RI para fines de clonación. Se usó ARN total aislado de la línea celular de hígado humano Hep3B en síntesis de primera cadena de ADNc monocatenario para PCR.

Para la preparación de ARN celular total, se dejaron crecer células Hep3B (Colección Americana de Cultivos Tipo) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Se indujo expresión de EPO tratando las células durante 18 h con Deferoxamina 130 µM o cloruro de cobalto 100 µM. Se ha mostrado que ambos compuestos inducen ARNm de EPO y expresión proteica en células Hep 3B (Wang y Semenza, 1993). Se aisló ARN de las células usando un kit RNeasy Mini (Qiagen, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aislaron aproximadamente 320 µg de ARN total de 1,4x10⁷ células tratadas con cloruro de cobalto y 270 µg de ARN total aislado de 1,4 x 10⁷ células tratadas con deferoxamina. Se realizó síntesis de primera cadena de ADNc monocatenario usando un Kit de Síntesis de ADNc de 1ª Cadena para RT-PCR (AMV) de Boehringer Mannheim Corp y se usaron hexámeros aleatorios como el cebador. Se llevaron a cabo reacciones de PCR posteriores usando los productos de las síntesis de primera cadena como moldes con los cebadores BB45 y BB47. El producto de PCR de aproximadamente 600 pb esperado se observó cuando se aplicaron los productos de reacción en un gel de agarosa. Ambas preparaciones de ARN produjeron un producto de PCR de EPO. El producto de PCR se digirió con *Bam* HI y *Eco* RI y se clonó en el vector pUC 19 que se había cortado con *Bam* HI y *Eco* RI y se había tratado con fosfatasa alcalina. La secuenciación de ADN identificó un clon que contenía la secuencia codificante correcta para el gen de EPO. Este plásmido se designó pBBT131 y se usó en la construcción de variantes de EPO por mutagénesis dirigida como se describe en el **Ejemplo 17**.

B. Expresión de rEPO de BV en células de insecto

Para expresión en células de insecto se modificó el ADNc de EPO en pBBT131 en los extremos tanto 5' como 3'. En el extremo 5', se añadió la secuencia CAAA inmediatamente cadena arriba del ATG iniciador para potenciar la traducción. Esta secuencia comprende una secuencia consenso de inicio de la traducción propuesta para baculovirus (Ayres *et al.*, 1994; Ranjan y Hasnain, 1995). En el extremo 3', se añadió ADN que codificaba la secuencia epitópica de FLAG de 8 aminoácidos (asp-tyr-lys-asp-asp-asp-lys) (SEC ID N°: 27) para proporcionar una sistema de purificación. El epitopo FLAG se fusionó con el gen de EPO mediante un enlazador flexible: ser-gly-gly-ser-gly-gly-ser (SEC ID N°: 28). Estas modificaciones se realizaron mediante PCR usando cebadores

oligonucleotídicos que incorporaron las adiciones deseadas a la secuencia de EPO. Se usó cebador oligonucleotídico BB63 (5' > CGCGGATCCAAAATGGGGTGCACGAATGTCCT>3) (SEC ID N°: 29) para modificar el extremo 5' del gen. BB63 añade la secuencia CAAA cadena arriba de la ATG, híbrida con la secuencia de ADN que codifica la metionina iniciadora y la parte amino terminal de la secuencia señal de EPO y contiene un sitio *Bam* HI para fines de clonación. Las secuencias de enlazador y FLAG se añadieron en dos reacciones de PCR secuenciales usando los cebadores inversos BB60 (5' > GTCTTTGTAGTCCGAGCCTCCGCTTCCGCCCGATCTGTCC CCTGTCCTGCA >3) (SEC ID N°: 30) y BB61 (5' > CGCGAATTCTTATTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCCGAGCCTCC >3) (SEC ID N°: 31). BB60 híbrida con 3' de la secuencia codificante de EPO y contiene la secuencia enlazadora peptídica fusionada y una parte de la secuencia FLAG. BB61 solapa con un segmento de la secuencia de BB60 que híbrida con el punto de unión de la secuencia de enlazador-FLAG y añade el resto de la secuencia FLAG seguido de un codón de parada de la traducción (TAA) y un sitio *Eco* RI para fines de clonación. El ADNc de EPO modificada se clonó como un fragmento *Bam* HI - *Eco* RI en pUC19 y la secuencia de ADN de esta construcción se confirmó. El plásmido resultante se designó pBBT132 y se usó en la construcción de variantes de EPO como se ha descrito en el Ejemplo 17. Para expresión en baculovirus, se escindió el ADNc de EPO "marcado con FLAG" de pBBT132 como fragmento *Bam* HI - *Eco* RI de aproximadamente 630 pb, se purificó en gel y se clonó en el vector de transferencia de baculovirus pBlueBac4.5 (Invitrogen) que se había cortado con *Bam* HI y *Eco* RI y se había tratado con fosfatasa alcalina. Se seleccionó un clon para uso adicional y se designó pBBT138.

Se usó ADN de pBBT138 para cotransfectar la línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda* Sf9 junto con ADN de baculovirus Bac-N-Blue™ (Invitrogen Corporation) linealizado (digerido con *Bsu*36 I). El genoma de Bac-N-Blue™ se modificó por ingeniería genética de modo que la formación de las partículas virales formadoras de placas requiera recombinación entre el ADN lineal de Bac-N-Blue™ y el vector pBlueBac4.5, dando como resultado la incorporación del gen de EPO clonado en el genoma de baculovirus. Esta recombinación obligada también da como resultado la incorporación de un gen de β-galactosidasa funcional en el genoma de baculovirus. La co-transfección se realizó de acuerdo con los protocolos del "Kit de Transfección de Bac-N-Blue™" de Invitrogen usando 2×10^6 células Sf 9 para generar un sobrenadante de aproximadamente 1 ml. Se ensayaron diluciones de este sobrenadante en células Sf 9 a 27 °C con respecto a formación de placas azules. Se seleccionaron diez placas azules y se subcultivaron. Cada placa se usó para inocular $2,5 \times 10^5$ células Sf 9 en un matraz T25 que contenía 5 ml de Medio de Insecto de Grace complementado con FBS 10 %. Después de 5 días los sobrenadantes de estas células infectadas (las reservas de "P1") se recogieron y ensayaron por transferencia de Western con respecto a expresión de EPO. Los diez sobrenadantes resultantes se prepararon en tampón de muestra de SDS con la adición de β-mercaptoetanol (BME) al 1 % y se sometieron a electroforesis en geles de poliácridamida de Tris-glicina 14 % prefabricados (Novex). Se incluyó sobrenadante de células SF9 no infectadas como un control negativo. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa de 0,45 μm (Novex). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó en Solución Tamponada con Tris (TBS) con Tween 20 0,05 % y leche en polvo 4 % (tampón de bloqueo). Se usó anticuerpo monoclonal de IgG₁ de ratón anti-FLAG M2 (Eastman KODAK) a dilución 1:1500 ó 1:2500 en tampón de bloqueo y la mancha de transferencia se incubó de forma rutinaria durante una noche a 4 °C. Se diluyó IgG₁ Anti-Ratón de Oveja (con el Sitio de Unión Limitado) conjugado con fosfatasa alcalina 1:1000 en tampón de bloqueo y la mancha de transferencia se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La transferencia de Western se reveló usando sustrato de revelado de color NBT/BCIP (Promega). Nueve de los diez aislados fueron positivos para expresión de EPO. El peso molecular de la proteína rEPO de BV fue de aproximadamente 30 kDa en condiciones reductoras y consistió en una banda principal y de una a dos bandas menores en este intervalo de peso molecular, lo que es coherente con una proteína glucosilada de forma variable.

Se ensayaron dos de los sobrenadantes positivos en el bioensayos de EPO *in vitro* descrito en el Ejemplo 16.D posterior. Ambos sobrenadantes estimularon la proliferación de la línea celular dependiente de EPO de una manera dependiente de dosis, lo que indica que contenían EPO activa. Los sobrenadantes de control de células Sf 9 infectadas con simulación y el sobrenadante de baculovirus que era negativo para la expresión de EPO por transferencia de Western no mostraron actividad detectable en el bioensayo de EPO.

Para producir y purificar cantidades mayores de rEPO de BV de tipo silvestre, se seleccionó un baculovirus recombinante positivo, denominado bvBBT138A, para amplificación adicional. Se preparó una reserva viral de alta titulación de 500 ml subcultivando la reserva P1 de aislado 138A a 27 °C en un cultivo de matraz de agitación de 500 ml de células Sf9 en Medio de Insectos de Grace complementado con FBS 10 %. El Medio de Insectos de Grace contiene L-cistina aproximadamente 100 μM. El sobrenadante de este cultivo se recogió después de 7 días y se descubrió que tenía una titulación de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de placa/ml. Se usó posteriormente una alícuota de este lisado, denominado la reserva "P2" para infectar un cultivo de 500 ml para producción a mayor escala de rEPO de BV de tipo silvestre. Se dejó crecer un cultivo de 500 ml de células Sf 9 en Medio de Insectos de Grace complementado con FBS 10 % en un matraz de agitación a una titulación de $1,0 \times 10^6$ / ml y después se infectó con bvBBT138A a una multiplicidad de infección de 1. Después de 3 días el sobrenadante de este cultivo se recogió y se purificó la proteína rEPO-138A de BV de tipo silvestre como se describe en el Ejemplo 16.C.

C. Purificación de afinidad de rEPO producida por baculovirus de tipo silvestre

El sobrenadante celular se clarificó por centrifugación y filtración de 0,2 μ M. La expresión de rEPO de BV de tipo silvestre se confirmó por análisis de transferencia de Western. rEPO de BV de tipo silvestre se purificó en un procedimiento de una etapa sencilla usando Gel de Afinidad M2 Anti-FLAG (Eastman KODAK). Brevemente, se lavaron 5 ml de gel afinidad de M2 con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM (TBS), 5 volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH 3,5, después se equilibró en TBS. El sobrenadante celular de baculovirus clarificado se ajustó a NaCl 150 mM y se añadió la resina equilibrada. Se permitió carga de lotes para continuar a 4 °C durante una noche en un aparato de frasco rotatorio. Después de incubación durante una noche, la resina se recuperó usando una columna XK 16/20 FPLC Pharmacia y se lavó con TBS hasta que A280 alcanzó la línea basal. La proteína unida se eluyó con glicina 0,1 M pH 3,5 y se recogieron fracciones y se neutralizaron con Tris 1,0 M pH 9,0. Se prepararon fracciones de columna en tampón de muestras de SDS-PAGE con la adición de BME 1 % cuando fue deseable y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida de tris-glicina 14 % prefabricados. Las fracciones de la columna de afinidad de M2 que contenían la mayoría de la rEPO de BV se agruparon y concentraron en un concentrador rotatorio Centricon 10 (Amicon). El rendimiento final de rEPO de BV, según se determinó usando un kit de ensayo de proteínas Bradford (BIO-RAD, Laboratories, Inc.) y albúmina de suero bovino (BSA) como el patrón, fue de aproximadamente 360 μ g. Se estimó que la proteína era mayor de 90 % pura por tinción de Azul de Coomassie de geles de SDS.

D. Bioactividad *in vitro* de rEPO de baculovirus de tipo silvestre

Se desarrolló un ensayo de proliferación celular usando la línea celular epo/UT7 humana (Komatsu *et al.*, 1991) para medir la bioactividad de rEPO de BV de tipo silvestre. La línea celular epo/UT7 humana se obtuvo del Dr. F. Bunn de la Escuela Médica de Harvard. Esta línea celular depende de EPO para la proliferación y supervivencia celular (Boissel *et al.*, 1993). Las células se mantuvieron en Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) complementado con FBS 10 %, penicilina 50 unidades/ml, estreptomycin 50 μ g/ml y rEPO 1 unidad/ml (expresada en células CHO (Ovario de Hámster Chino); obtenidas de R&D Systems, Inc.). Para bioensayos, las células se lavaron tres veces con medio IMDM y se resuspendieron a una concentración de 1×10^5 células/ml en medio IMDM que contenía FBS 10 %, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 μ g/ml. Se separaron alícuotas cincuenta μ l de la suspensión celular (5×10^3 células) por pocillo de ensayo de una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. Se prepararon diluciones seriadas 3 veces de las muestras de proteína a ensayar en medio IMAM sin rojo fenol que contenía FBS 10 %, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 μ g/ml. Se añadieron 50 μ l de las muestras de proteína diluidas a los pocillos de ensayo y las placas se incubaron a 37 °C en un incubador de cultivo tisular de CO₂ 5 % humidificado. Las muestras de proteína se ensayaron en pocillos por triplicado. Después de 60-72 h, se añadieron 20 μ l de CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega Corporation) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C en el incubador de tejido tisular durante 1-4 h. La absorbancia de los pocillos se leyó a 490 nm usando un lector de microplaca. Los pocillos de control contenían medio pero no células. Los valores medios de la absorbancia para los pocillos de control por triplicado se restaron de los valores medios obtenidos para cada conjunto de pocillos de ensayo por triplicado. Se analizaron diluciones seriadas de rEPO expresada en células CHO o rEPO de BV de tipo silvestre en paralelo.

La línea celular UT7/epo muestra una respuesta proliferativa fuerte para rEPO, como se demuestra por un aumento dependiente de dosis del número de células y los valores de absorbancia. La absorbancia es proporcional al número de células hasta valores de 2,0 (especificaciones de producto de Promega Corporation). En ausencia de rEPO, la mayoría de las células UT7/epo mueren, dando valores de absorbancia menores de 0,1. rEPO expresada en células CHO comercial y rEPO de BV de tipo silvestre preparada por los inventores alcanzaron el mismo nivel máximo de estimulación, dentro del error del ensayo y tuvieron CE₅₀ medias similares en el bioensayo de aproximadamente 0,4-0,5 ng/ml (Tabla 2). Los valores de CE₅₀ para estas proteínas variaron de 0,21 a 0,65 ng/ml en ensayos realizados en diferentes días (Tabla 2); por lo tanto se realizaron comparaciones entre muestras proteicas en muestras analizadas el mismo día. Estos valores de CE₅₀ concuerdan con valores presentados en las especificaciones de R&D Systems para rEPO de CHO (0,05 – 0,1 unidades/ml o aproximadamente 0,4-0,8 ng/ml).

Ejemplo 17

55 Construcción, expresión, purificación y bioactividad de muteínas de cisteína de EPO

A. Construcción de muteínas de cisteína de EPO.

Se construyeron ocho genes mutantes de EPO usando procedimientos de mutagénesis basada en PCR dirigida similares a los usados para construir las muteínas de Hormona del Crecimiento descritos en el Ejemplo 4 (Innis *et al.* 1990; Horton *et al.*, 1993). Los inventores construyeron cuatro muteínas en o cerca de los dos sitios de glucosilación ligados en N en el bucle A-B (N24C, T26C, N38C y T40C), dos muteínas en o cerca del sitio de glucosilación ligado a N en el bucle B-C (N83C y S85C), una muteína en el sitio de glucosilación ligado a O en el bucle C-D (S126C) y una muteína (*167C), que añade una cisteína entre el resto R166 carboxi terminal natural y la extensión carboxi terminal de 15 aminoácidos que consiste en el enlazador peptídico y secuencias FLAG. El molde para las reacciones

de PCR mutagénicas fueron pBBT131 plasmídico, en el que el gen de EPO no modificado se clona como un fragmento *Bam* HI – *Eco* RI en pUC 19. Los productos de PCR se digirieron con endonucleasas de restricción apropiadas, se purificaron en gel y se ligaron con ADN del vector pBBT132 que se había cortado con enzimas de restricción apropiadas, se trataron con fosfatasa alcalina y se purificaron en gel. Como se ha detallado anteriormente, pBBT13 es un derivado de pUC19 que porta el gen de EPO clonado modificado (marcado con FLAG). Se cultivaron transformantes de estas ligaciones y se aislaron y secuenciaron ADN plasmídicos. La secuencia del fragmento de PCR mutado clonado completo se determinó para verificar la presencia de la mutación de interés y la ausencia de cualquier mutación adicional que pudiera introducirse potencialmente por la reacción de PCR o por los cebadores oligonucleotídicos sintéticos.

La mutación de sustitución de cisteína N24C se construyó como sigue. El oligonucleótido directo mutagénico BB64 (5> GAGGCCAAGGAGGCCGAGTGTATCACGACGGGCTGTGCT >3) (SEC ID N°: 32) se diseñó para cambiar el codón AAT para asparagina en la posición 24 a un TGT que codifica cisteína y para abarcar el sitio *Sty* I cercano. Este oligo se usó en PCR con el cebador mutagénico inverso BB47 (5> CCCGAATTCTGGTGGATATGCCAGGTGGAC >3) (SEC ID N°: 33) que hibrida con secuencias de ADN 3' de la secuencia codificante de EPO. Se realizó una reacción de PCR de 50 µl en tampón de PCR Promega 1X que contenía MgCl₂ 1,5 mM, cada cebador a 0,2 µM, cada uno de dATP, dGTP, dTTP y dCTP a 200 µM, 1 ng de plásmido molde pBBT131 (descrito en el Ejemplo 16), 1,5 unidades de Taq Polimerasa (Promega) y 0,25 unidades de Pfu polimerasa (Stratagene). Las reacciones se realizaron en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). El programa de reacción implicó: 96 °C durante 3 minutos, 25 ciclos de [95 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1,25 minutos, 72 °C durante 1 minuto] seguido de un mantenimiento a 6 °C. Se analizó una alícuota de 5 µl de la reacción de PCR por electroforesis de gel de agarosa y se descubrió que producía un fragmento sencillo del tamaño esperado de aproximadamente 470 pb. El resto de la reacción se "limpió" usando la purificación de PCR QIAquick (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor, se digirió con *Sty* I y *Bsr* GI (New England BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se precipitó en etanol, se resuspendió en 20 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,5 y se ejecutó en un gel de agarosa 2 %. El fragmento *Sty* I - *Bsr* GI de aproximadamente 400 pb de interés se purificó en gel usando un kit de extracción en gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Este fragmento se ligó con pBBT132 (descrito en el Ejemplo 16) que se había cortado con *Sty* I y *Bsr* GI, tratado con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (New England BioLabs) y purificado en gel. La reacción de ligación se usó para transformar *E. coli* y se secuenciaron plásmidos de transformantes resultantes para identificar un clon que contenía la mutación N24C y que tenía la secuencia correcta a lo largo del resto del segmento *Sty* I - *Bsr* GI de aproximadamente 400 pb.

La mutación de sustitución T26C se construyó y su secuencia se verificó usando el protocolo descrito anteriormente para N24C excepto que se usó oligo directo mutagénico BB65 (5> GAGGCCAAGGAGGCCGAGAAATCTGTACGGGCTGTGCT >3) (SEC ID N°: 34) en lugar de BB64.

La mutación de sustitución N38C se construyó usando la técnica de "mutagénesis por extensión de solapamiento" como se ha descrito en el Ejemplo 4. Con la excepción del uso de diferentes cebadores oligonucleotídicos, las reacciones de PCR iniciales o "primarias" para la construcción de N38C se realizaron de forma idéntica a las descritas en la construcción de N24C anteriormente. Los pares de cebadores usados fueron (BB66 + BB47) y (BB67 + BB45). Se ha descrito BB47 anteriormente. El cebador no mutagénico directo BB45 (5> CCCGGATCCATGGGGGTGCACGAATGTCCTG >3) (SEC ID N°: 35) hibrida con la secuencia de EPO que codifica los primeros siete aminoácidos de EPO. BB66 y BB67 son oligonucleotídicos mutagénicos complementarios que cambian el codón de AAT para N38 a un codón TGT para cisteína. La secuencia de BB66 es (5> AGCTTGAATGAGTGTATCACTGTCCCAGACACC >3) (SEC ID N°: 36) y la secuencia de BB67 es (5> GGTGTCTGGGACAGTGATACACTCATTCAAGCT >3) (SEC ID N°: 37). Las reacciones de PCR (BB66 x BB47) y (BB67 x BB45) proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 420 pb para (BB66 x BB47) y aproximadamente 220 pb para (BB67 x BB45). Los productos de PCR se precipitaron con etanol, se purificaron en gel y se recuperaron en 20 µl de Tris-HCl 10 mM como se ha detallado anteriormente. Estos dos fragmentos mutados se "cortaron y empalmaron" después juntos en la reacción de PCR o posterior o "secundaria". En esta reacción se usó 1 µl de cada uno de los productos de PCR purificados en gel de las reacciones primarias como molde y se usaron BB45 y BB47 como cebadores. Por lo demás, las condiciones de reacción fueron idénticas a las usadas en las reacciones primarias. Se analizó una alícuota de la PCR secundaria por electroforesis en gel de agarosa y se observó la banda esperada de aproximadamente 630 pb. El volumen de la reacción de PCR secundaria se "limpió" usando la purificación de PCR QIAquick (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor, se digirió con *Sty* I y *Bsr* GI (New England BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se precipitó con etanol, se resuspendió en 20 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 y se ejecutó en un gel de agarosa 2 %. El fragmento *Sty* I - *Bsr* GI de aproximadamente 400 pb de interés se purificó en gel usando un kit de extracción en gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Este fragmento se ligó con pBBT132 (descrito en el Ejemplo 16) que se había cortado con *Sty* I y *Bsr* GI, se había tratado con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (New England BioLabs) y se había purificado en gel. La reacción de ligación se usó para transformar *E. coli* y se secuenciaron plásmidos de transformantes resultantes para identificar un clon que contenía la mutación N38C y que tenía la secuencia correcta en todo el segmento *Sty* I - *Bsr* GI de aproximadamente 400 pb.

La mutación de sustitución T40C se construyó y se verificó su secuencia usando los procedimientos descritos anteriormente para N38C excepto que los cebadores mutagénicos complementarios BB68 (5' AGCTTG AATGAGAATATCTG TGTCCCAGACACC' >3) (SEC ID N°: 38) y BB69 (5' GGTGTCTGGGACACAGATATTCTCATTCAAGCT >3) (SEC ID N°: 39), que cambian el codón ACT para T40 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron a BB66 y BB67 respectivamente en las reacciones de PCR primarias.

La mutación de sustitución N83C se construyó y se verificó su secuencia usando los procedimientos descritos anteriormente para N38C excepto que los cebadores mutagénicos complementarios BB70 (5' GCCCTGTTGGTCTGCTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTG >3) (SEC ID N°: 40) y BB71 (5' CAGGGGCTCCCACGGCTGG GAAGAGCAGACCA ACAGGGC >3) (SEC ID N°: 41), que cambian el codón AAC para N83 a un codón TGC para cisteína, reemplazaron BB66 y BB67 respectivamente, en las reacciones de PCR primarias. Los tamaños de los productos de las reacciones de PCR primarias también fueron diferentes. La reacción (BB70 x BB47) proporcionó, como se ha predicho, un producto de aproximadamente 300 pb y la reacción (BB71 x BB45) proporcionó, como se ha predicho, un producto de aproximadamente 360 pb.

La mutación de sustitución S85C se construyó y se verificó su secuencia usando los procedimientos descritos anteriormente para N38C excepto que los cebadores mutagénicos complementarios BB72 (5' GCC CTGTTGGTCAAC TCTTGCCAGCCGTGGGAGCCCCTG >3) (SEC ID N°: 42) y BB73 (5' CAGGGGCTCCCACGGCTGGCAAGAGTTGACCAACAGGGC >3) (SEC ID N°: 43), que cambian el codón TCC para S85 a un codón TGC para cisteína, reemplazaron a BB66 y BB67 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Los tamaños de los productos de las reacciones de PCR primarias también fueron diferentes. La reacción (BB72 x BB47) proporcionó, como se ha predicho, un producto de aproximadamente 300 pb y la reacción (BB73 x BB45) proporcionó, como se ha predicho, un producto de aproximadamente 360 pb.

La mutación de sustitución S126C se construyó usando los procedimientos descritos anteriormente para N38C excepto que los cebadores mutagénicos complementarios BB74 (5' CCAGATGCGGCCTGTGCTGC TCCACTC >3) (SEC ID N°: 44) y BB75 (5' GAGTGGAGCAGCACAGGCCGCATCTGG >3) (SEC ID N°: 45), que cambian el codón TCA para S126 a un codón TGT para cisteína reemplazaron BB66 y BB67 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Los tamaños de los productos de las reacciones de PCR primarias también fueron diferentes. La reacción (BB74 x BB47) proporcionó, como se ha predicho, un producto de aproximadamente 175 pb y la reacción (BB75 x BB45) proporcionó, como se ha predicho, un producto de aproximadamente 480 pb.

También se construyó una mutación que añadía una cisteína después del aminoácido carboxi terminal de la secuencia codificante de EPO. Este mutante, denominado *167C se construyó como sigue. Se llevó a cabo una reacción de PCR en las condiciones descritas anteriormente para la construcción del mutante N24, pero empleando los oligonucleótidos BB45 (véase anteriormente) y el oligonucleótido mutagénico inverso BB77 (5' TTTGTAGTCCGAG CCTCCGCTTCCGCCGAACA TCTGTCCCCTGTCTGCA' >3) (SEC ID N°: 46) y usando 2,5 unidades de Taq polimerasa y 0,5 unidades de Pfu polimerasa. BB77 hibrida con los 21 restos terminales de la secuencia codificante de EPO y añade un codón TGT para cisteína después del codón AGA para R166, que es el aminoácido terminal en la secuencia codificante de EPO. BB77 también añade secuencias que codifican el enlazador de siete aminoácidos -ser-gly-gly-ser-gly-gly-ser- (SEC ID N°: 27) y una parte de la secuencia epitópica FLAG. El producto de aproximadamente 630 pb de esta reacción de PCR se purificó en gel y se usó como un molde en una reacción de PCR posterior que empleaba las mismas condiciones de reacción pero usando los cebadores BB47 y BB61 (5' CGCGAATTCTTATTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCCGAGCCTCC >3) (SEC ID N°: 30) que añade el resto de la secuencia epitópica de FLAG seguido de un codón de parada TAA y un sitio de clonación de *Eco* RI. El producto de aproximadamente 675 pb de esta reacción de PCR se "limpió" usando la purificación de PCR QIAquick (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor, se digirió con *Sty* I y *Eco* RI (New Engly BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se precipitó con etanol, se resuspendió en 20 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,5 y se ejecutó en un gel de agarosa 2 %. El fragmento *Eco* RI - *Bsr* GI de aproximadamente 86 pb de interés se purificó en gel usando un kit de extracción en gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Este fragmento se ligó con pBBT132 (descrito en el Ejemplo 16) que se había cortado con *Eco* RI y *Bsr* GI, se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (New Engly BioLabs) y se purificó en gel. La reacción de ligación se usó para transformar *E. coli* y se secuenciaron los plásmidos de transformantes resultantes para identificar un clon que contenga la mutación *167C y que tenga la secuencia correcta por todo el segmento *Eco* RI - *Bsr* GI de aproximadamente 86 pb.

Para expresión en baculovirus, los genes de EPO que codifican las ocho muteínas se escindieron de los derivados de PBBT132 basados en pUC19 como fragmentos *Bam* HI - *Eco* RI de aproximadamente 630 pb y se subclonaron en el vector de transferencia de baculovirus pBlueBac4.5 usado para expresar EPO de tipo silvestre.

Usando procedimientos similares a los descritos en este documento, pueden construirse otras muteínas de cisteína de EPO. Las muteínas de cisteína pueden ser mutaciones de sustitución que sustituyan con cisteína un resto amino natural en la secuencia codificante de EPO, mutaciones de inserción que insertan un resto de cisteína entre dos aminoácidos de origen natural en la secuencia codificante de EPO o mutaciones de adición que añaden un resto de cisteína antes del primer aminoácido, A1, de la secuencia codificante de EPO o añaden un resto de cisteína después del resto aminoácido terminal, R166, de la secuencia codificante de EPO. Los restos de cisteína pueden sustituir a

cualquier aminoácido o insertarse entre dos aminoácidos cualesquiera, en cualquier sitio en la secuencia codificante de EPO. Los sitios preferidos para sustituir o insertar restos de cisteína en EPO son en la región antes de hélice A, el bucle A-B, el bucle B-C, el bucle C-D y la región distal a hélice D. Otros sitios preferidos son los primeros o últimos tres aminoácidos de las hélices A, B, C y D. Son restos preferidos en estas regiones para crear sustituciones de cisteína A1, P2, P3, R4, L5, D8, S9, I25, T27, G28, A30, E31, H32, S34, N36, 139, D43, T44, K45, N47, Y49, A50, K52, R53, M54, E55, G57, Q58, G77, Q78, A79, S84, Q86, W88, E89, T107, R110, A111, G113, A114, Q115, K116, E117, A118, S120, P121, P122, D123, A124, A125, A127, A128, R131, T132, K154, Y156, T157, G158, E159, A160, T163, G164, D165, R166. También pueden insertarse restos de cisteína inmediatamente antes o después de estos aminoácidos. Otro sitio preferido para añadir un resto de cisteína sería delante de A1, que los inventores denominan *-1C.

También pueden construirse muteínas de EPO que contengan una cisteína sustituyendo con otro aminoácido uno de los restos de cisteína de origen natural en EPO. El resto de cisteína de origen natural que normalmente forma un enlace disulfuro con el resto de cisteína sustituido ahora está libre. El resto de cisteína no esencial puede reemplazarse con cualquiera de los otros 19 aminoácidos, pero preferiblemente con un resto de serina o alanina. También puede introducirse un resto de cisteína libre en EPO por modificación química de un aminoácido de origen natural usando procedimientos tales como los descritos en Sytkowski *et al.* (1998).

Usando procedimientos similares a los descritos en los Ejemplos 16 - 19, se pueden expresar las proteínas en células eucariotas (por ejemplo, células de insecto o células de mamífero), purificar las proteínas, pegar las proteínas y medir sus bioactividades en un bioensayo *in vitro*. Las muteínas de EPO también pueden expresarse en células procariontas tales como *E. coli* usando procedimientos similares a los descritos en los Ejemplos 1-15 o procedimientos relacionados bien conocidos por los expertos en la materia.

25 B. Expresión de células de insecto de muteínas de EPO-Cys.

Para experimentos de expresión, se usaron los ocho plásmidos que codifican genes de EPO mutantes para cotransfectar células Sf 9 junto con ADN de Bac-N-Blue™ linealizado usando los procedimientos descritos anteriormente para el plásmido pBBT138, que codifica EPO de tipo silvestre. Los sobrenadantes de transfección se ensayaron en células Sf 9 con respecto a formación de placas azules. Para cada mutante, se seleccionaron diez placas azules y se subcultivaron como se ha descrito en el Ejemplo 16. Cinco de los diez sobrenadantes resultantes se exploraron por SDS-PAGE y transferencia de Western para detectar expresión de las muteínas de EPO. Se llevó a cabo análisis de transferencia de Western usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 16 para EPO de tipo silvestre. Los resultados de Western mostraron que al menos 3 de los 5 sobrenadantes explorados de cada clon contenían proteína EPO marcada con FLAG. Los resultados de transferencia de Western también revelaron que los plásmidos que codifican muteínas que deberían evitar la glucosilación en uno de los sitios de glucosilación ligados a N (N24C, T26C, N38C, T40C, N83C y S85C) produjeron proteínas con pesos moleculares aproximadamente 2.200-2800 Dalton menores que rEPO de BV de tipo silvestre. Por el contrario, la muteína S126 en el sitio de glucosilación ligado a O y *167C (adición de cisteína C-terminal) produjeron proteínas de EPO que migraban conjuntamente con rEPO de BV de tipo silvestre. Estos resultados son coherentes con la observación de que las células de insecto típicamente realizan glucosilación ligada a N y que los grupos de azúcares unidos a sitios de glucosilación ligados a O son generalmente pequeños y provocan aumentos mínimos en el peso molecular de una proteína. Se ha indicado que las células de insecto realizan glucosilación ligada a O (Davies, 1995).

Para purificar cantidades mayores de las muteínas de EPO se seleccionó un aislado de baculovirus recombinante positivo que codificaba cada muteína para amplificación adicional. Se preparó una reserva viral de alta titulación de 500 ml de cada una de las reservas de P1 mutante subcultivando como se ha descrito anteriormente para el aislado de tipo silvestre. Se usó posteriormente una alícuota de cada uno de estos lisados P2 para infectar un cultivo de 500 ml para producción a mayor escala de cada una de las muteínas de EPO usando los procedimientos descritos para EPO de tipo silvestre en el Ejemplo 16. Los sobrenadantes de 500 ml de células infectadas por baculovirus se esterilizaron por filtración posteriormente y se almacenaron a 4 °C. Las muteínas de rEPO-Cys se purificaron usando una columna de gel de afinidad M2 anti-FLAG (Eastman Kodak), usando un lote diferente de resina para cada muteína para asegurar que no había contaminación cruzada. Se lavaron primero 5 ml de resina con Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (TBS), seguido de Glicina 0,1 M, pH 3,0 y finalmente se reequilibró en TBS. Se añadió cloruro sódico al filtrado de cultivo de baculovirus a una concentración final de 0,15 M antes de que se añadiera la resina de afinidad. La resina se cargó en lotes en un aparato de frasco rotatorio durante una noche a 4 °C. A la mañana siguiente la resina se capturó usando una columna XK16 de Pharmacia y se lavó con TBS hasta que la A280 alcanzó la línea basal. Las muteínas de rEPO-Cys se eluyeron con Glicina 0,1 M, pH 3,0. Se recogieron fracciones (1,5 ml) en tubos que contenían 20 µl de base de Tris 1M, pH 9,0 para neutralizar la solución. Basándose en los cromatogramas y análisis de SDS-PAGE, se agruparon y congelaron las fracciones que contenían proteínas de rEPO-Cys predominantemente puras. Las recuperaciones de proteínas de los cultivos de sobrenadante de 500 ml variaron de 75 a 800 µg, dependiendo de la muteína (Tabla 2).

Las muteínas de rEPO-Cys purificadas migraron con pesos moleculares aparentes de 27-30 kDa en condiciones no reductoras, coherentes con que las proteínas fueran monoméricas. Los pesos moleculares aparentes de las muteínas de rEPO-Cys quedan en dos clases, supuestamente debido a diferencias de glucosilación. Las proteínas

de rEPO-Cys que contenían mutaciones en el sitio de O-glucosilación (S126C) y en el extremo C-terminal (*167C) migraron a una posición similar a rEPO de BV de tipo silvestre. Las proteínas que contenían mutaciones que deberían evitar la glucosilación de uno de los sitios de glucosilación ligados a N (proteínas N24C, T26C, N38C, T40C, N83C y S85C) migraron con pesos moleculares aparentes de 27-28 kDa, ligeramente más pequeños que rEPO de BV de tipo silvestre. Sorprendentemente, la proteína S85C migró como doblete en condiciones tanto reductoras como no reductoras; la banda principal del doblete fue el tamaño esperado para una proteína sin glucosilación en uno de los sitios de glucosilación ligada a N, aunque la banda menor fue del tamaño esperado para rEPO de BV de tipo silvestre completamente glucosilada. Todas las placas de baculovirus recombinantes originales aisladas para la muteína S85C produjeron proteínas de rEPO que migraron como dobletes, lo que sugiere que el doblete se debe a glucosilación parcial en N83 (u otro aminoácido) en lugar de contaminación de S85C con EPO de BV de tipo silvestre o proteínas de S126C o *167C. Varias de las muteínas, por ejemplo, S126C, *167C, tenían pequeñas cantidades de una segunda proteína que migraba con un peso molecular aparente de 45-55 kDa, dependiendo de la muteína. Este es el peso molecular esperado para dímeros de rEPO ligados por disulfuro. Estas bandas reaccionaron con el anticuerpo anti-FLAG en transferencias de Western y estaban ausentes cuando los geles de SDS se ejecutaron en condiciones reductoras. Estos datos indican que las bandas de 45-55 kDa representan dímeros de rEPO-Cys ligados por disulfuro.

C. Bioactividades de muteínas de cisteína de EPO.

Las actividades biológicas de las muteínas de rEPO-Cys purificadas se midieron en el ensayo de proliferación de células UT7/epo descrito en el Ejemplo 16. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando un ensayo de Bradford. Debido al gran número de muestras las muteínas se dividieron en dos grupos para su análisis: las muteínas T26C, T40C, N83C y S126C comprendían un grupo y las muteínas N24C, N38C, S85C y *167C comprendían el segundo grupo. Las muteínas dentro de un grupo se analizaron el mismo día. rEPO de BV de tipo silvestre y rEPO de CHO se analizaron en paralelo los mismos días para controlar con respecto a variabilidad entre días en los ensayos. Todas las muteínas estimularon la proliferación de células UT7/epo y tuvieron CE₅₀ que estaban dentro de tres veces las de las proteínas de control de rEPO de tipo silvestre. Las CE₅₀ medias para las muteínas N24C, T26C, N83C, S85C, S126 y *167C fueron similares a las CE₅₀ medias para rEPO de BV de tipo silvestre y rEPO de CHO, promediando 0,3-0,8 ng/ml (Tabla 2). Las CE₅₀ medias para las proteínas N38C y T40C fueron de aproximadamente 1 ng/ml (Tabla 2).

Bill *et al.*, (1995) presentaron expresión de las muteínas de cisteína de EPO, N24C, N38C y N83C, en *E. coli*. A diferencia de los resultados de los inventores, ellos indicaron que las bioactividades de estas muteínas de cisteína se reducían significativamente en relación con EPO de tipo silvestre. La bioactividad de la muteína N38C se redujo a menos del 20 % de la bioactividad de EPO de tipo silvestre y las bioactividades de las muteínas N24C y N83C se redujeron a menos del 5 % de la bioactividad de EPO de tipo silvestre. No se indicaron las CE₅₀. Bill *et al.* (1995) postularon que las actividades reducidas de las muteínas de cisteína se debían a plegamiento inapropiado debido a formación incorrecta de puentes disulfuro resultantes de los restos de cisteína extra introducidos en las proteínas. No emplearon cistina u otros agentes de bloqueo de cisteína en las soluciones usadas para purificar las muteínas de cisteína.

Basándose en los resultados de Bill *et al.* (1995), fue sorprendente que las muteínas N24C, N38C y N83C purificadas de los inventores tuvieran actividades biológicas iguales a, o dentro de 3 veces de, EPO de tipo silvestre. Los datos indican que los métodos de los inventores para expresión y purificación de las muteínas de cisteína de EPO dan como resultado proteínas con actividades biológicas *in vitro* superiores en comparación con los métodos empleados por Bill *et al.* (1995).

Tabla 2. Propiedades de muteínas de cisteína de EPO humana

Plásmido de expresión	Proteína de EPO	Recuperación de proteína µg / 500 ml	Localización de la mutación	Media de CE ₅₀ (ng/ml)	Intervalo de CE ₅₀
-	rEPO (CHO)	-	-	0,50	0,29-0,65 (N=6)
pBBT138	rEPO(BV)	345	-	0,37	0,21-0,51 (N=6)
pBBT150	N24C	75	Bucle A-B	0,76	0,58, 0,85, 0,85
pBBT151	T26C	805	Bucle A-B	0,27	0,21, 0,22, 0,39
pBBT152	N38C	85	Bucle A-B	1,05	0,65, 1,20, 1,30
pBBT161	T40C	102	Bucle A-B	0,95	0,60, 0,75, 1,50
pBBT162	N83C	96	Bucle B-C	0,50	0,42, 0,49, 0,60
pBBT153	S85C	135	Bucle B-C	0,72	0,50, 0,80, 0,85

Plásmido de expresión	Proteína de EPO	Recuperación de proteína $\mu\text{g} / 500 \text{ ml}$	Localización de la mutación	Media de CE_{50} (ng/ml)	Intervalo de CE_{50}
pBBT154	S126C	220	Bucle C-D	0,31	0,25, 0,25, 0,42
pBBT155	*167C	129	C-terminal	0,61	0,51, 0,65, 0,68
¹ Datos de experimentos individuales. Se muestra un intervalo cuando $N > 3$.					

EJEMPLO 18

Pegilación de muteínas de cisteína de EPO

5

A. Pegilación a pequeña escala de muteínas de cisteína de EPO

Se ensayaron varias muteínas de cisteína y EPO de tipo silvestre con respecto a su capacidad para pegilarse con un PEG sensible cisteína de 5 kDa después del tratamiento con el agente reductor TCEP (Tris (2-carboxietil) fosfina-HCl). Se realizó un estudio de titulación con la muteína T26C para identificar las concentraciones de reactivo de PEG y TCEP apropiadas para pegilación, evitando la reducción excesiva de la proteína. Los inventores controlaron la reducción parcial de la proteína por SDS-PAGE usando rEPO de BV de tipo silvestre como un control. Se ensayaron concentraciones crecientes de TCEP (exceso de 0,5 M a 6,0 M) en presencia de un exceso molar de 10 a 40 veces de PEG de 5kDa (Fluka) de vinilsulfona o maleimida. Las reacciones se analizaron por SDS-PAGE no reductor. La rEPO de BV de tipo silvestre se trató en paralelo como un control para identificar condiciones de reducción parciales que produjeran cantidades significativas de muteínas de EPO-Cys monopegiladas (una molécula de PEG sencilla unida a la muteína de EPO-Cys), pero no pegilación de rEPO de BV de tipo silvestre. Un exceso molar de 5 veces de TCEP y un exceso molar de 30 veces de vinilsulfona-PEG de 5 kDa produjeron cantidades significativas de proteína T26C monopegilada sin pegilación de rEPO de BV de tipo silvestre.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Basándose en los hallazgos de los inventores con la muteína de T26C, se usaron las siguientes condiciones para pegilar varias otras muteínas de cisteína. Se incubaron alícuotas (1-2 μg) de rEPO de BV purificada y muteínas de EPO-Cys durante 1 hora con un exceso molar 5X de TCEP y un exceso molar 30X de vinilsulfona PEG 5 kDa a pH 8,0 a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron por dilución en tampón de muestra de SDS (sin agente reductor) y se analizaron por SDS-PAGE. Se monopegilaron cuatro muteínas de cisteína (N24C, T26C, S126C y *167C) fácilmente en estas condiciones, como se demuestra por la aparición de una nueva banda de proteína que migra a aproximadamente 35 kDa. La especie de 35 kDa es el tamaño esperado para EPO monopegilada; no se detectaron especies dipegiladas que se espera que tengan pesos moleculares de aproximadamente 40 kDa para cualquiera de las muteínas de EPO-Cys en estas condiciones de reacción. Los experimentos de control indicaron que las muteínas de cisteína necesitan reducirse con TCEP para pegilarse. EPO de BV de tipo silvestre no se pegiló en condiciones reductoras parciales idénticas. Estos datos indican que la molécula de PEG se une a la cisteína libre introducida en las muteínas de EPO-Cys N24C, T26C, S126C y *167C.

B. Preparación de PEG-T26C y PEG-S126C para mediciones de bioactividad.

35

40

45

50

55

Los inventores pegilaron cantidades mayores de las proteínas T26C y S126C de modo que las proteínas pegiladas pudieran purificarse para mediciones de bioactividad. Las reacciones de pegilación se cambiaron de escala para incluir 75 μg de cada proteína y las mismas relaciones molares de TCEP y PEG de 5kDa usadas en las reacciones de 1 μg más pequeñas. Después de una hora, la mezcla de pegilación se diluyó 10X con Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol 20 % (tampón A) y se cargó inmediatamente en una columna de Q-Sepharose de 1 ml equilibrada en tampón A. La columna se lavó con tampón de equilibrio y las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente salino creciente lineal de 10 volúmenes de NaCl de 0 a 150 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol 20 %. La presencia del resto de PEG redujo la afinidad de la proteína por la resina, permitiendo que la proteína pegilada se separara de la proteína no pegilada. Las fracciones que contenían proteína monopegilada se identificaron por SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie. Las fracciones que contenían PEG-T26C pero no proteína no derivatizada visible, se almacenaron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se usaron posteriormente en bioensayos. Se usaron procedimientos similares para obtener PEG-S126C purificada. Se realizó una transferencia de Western para evaluar la pureza de las preparaciones de PEG-T26C y PEG-S126C usadas en bioensayos. La transferencia de Western se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 16. La transferencia de Western proporcionó señales fuertes a los tamaños esperados para PEG-T26C y PEG-S126C, pero no detectó ninguna proteína que migrara a las posiciones esperadas para las proteínas S126C y T26C no pegiladas. A partir de estos resultados, los inventores concluyen que hay poca proteína no pegilada (< 5 %) presente en las muteínas pegiladas purificadas.

C. Bioactividades de las muteínas de cisteína PEG-T26C y PEG-S126C.

55

Las actividades biológicas de las proteínas PEG-T26C y PEG-S 126C purificadas se midieron en el ensayo de

proliferación de células UT7/epo descrito en el Ejemplo 16. Las concentraciones de proteína de las muteínas PEG-EPO-Cys se cuantificaron usando un kit de ELISA de EPO humana (R & D Systems), siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante. Las concentraciones proteicas de las muteínas no pegiladas y rEPO de BV de tipo silvestre también se cuantificaron por ELISA. El ensayo de ELISA se realizó en todas las proteínas el mismo día. Se prepararon diluciones en serie tres veces de las muestras proteicas y se analizaron en el bioensayo. El material no usado de cada dilución en serie se almacenó congelado a -80 °C y se analizó posteriormente en el ELISA para determinar una concentración proteica precisa para el material de partida. Se analizaron varias de las diluciones seriadas para cada muestra proteica para asegurar que la concentración de proteína en al menos una muestra quede dentro del intervalo lineal de la curva de ELISA patrón, que es de 0,0025 – 0,2 unidades/ml o aproximadamente 0,02 – 1,6 ng/ml. Al menos dos de las diluciones seriadas para cada muestra quedaban dentro de este intervalo lineal.

Las actividades biológicas para las muteínas PEG-T26C y PEG-S 126C fueron similares a las de las proteínas T26C y S126C no modificadas y rEPO de BV de tipo silvestre. Las CE₅₀ medias para las muteínas PEG-T26C y PEG-S126C fueron similares a los valores de CE₅₀ medios determinados para las muteínas T26C y S126C no pegiladas y rEPO de BV de tipo silvestre, que variaban de 0,48 a 0,82 ng/ml (Tabla 3). No se han descrito previamente proteínas EPO pegiladas biológicamente activas.

Tabla 3. Bioactividades de muteínas EPO PEGCys

Proteína EPO	CE ₅₀ media (ng/ml)	Intervalo ¹ de CE ₅₀ (ng/ml)
BVEPO	0,82	0,55, 0,95, 0,95
T26C	0,73	0,50, 0,85, 0,85
PEG-T26C	0,58	0,35, 0,65, 0,75
S126C	0,74	0,65, 0,75, 0,82
PEG-S126C	0,48	0,38, 0,52, 0,55

¹ Datos de tres experimentos.

20

Ejemplo 19

Expresión y purificación de muteínas de cisteína de EPO en células de mamífero.

Las muteínas de cisteína de EPO también pueden expresarse en células de mamífero y purificarse de los medios condicionados. Las muteínas de cisteína de EPO pueden expresarse por transfección transitoria de células de mamífero o construyendo líneas celulares de mamífero transformadas de forma estable que expresan las muteínas de cisteína de EPO. Para aplicaciones terapéuticas en seres humanos, es preferible que las muteínas de cisteína de EPO se expresen sin el enlazador y secuencias FLAG. Pueden usarse células COS de mono (disponibles de la colección americana de cultivos tipo) para experimentos de transfección transitoria, usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Varias fuentes comerciales, por ejemplo, GIBCO/BRL, venden reactivos de transfección lipídica y proporcionan protocolos detallados que pueden usarse para expresar las muteínas de cisteína de EPO por transfección transitoria. Se fabrica EPO de tipo silvestre para su uso en seres humanos usando células de ovario de hámster chino (CHO) transformadas de forma estable que expresan la proteína. Las líneas celulares CHO transfectadas de forma estable se usan ampliamente para expresión de alto nivel de proteínas recombinantes (Geisse *et al.* 1996; Trill *et al.* 1995). En células CHO, puede conseguirse expresión de alto nivel de genes heterólogos integrados en los cromosomas por amplificación génica. Típicamente el gen de interés está ligado a un gen marcador para el que se puede seleccionar la amplificación. Se ha descrito una diversidad de genes que proporcionan selecciones para amplificación (Kaufman 1990) pero se emplea frecuentemente dihidrofolato reductasa (dhfr) murina. La amplificación de este gen confiere resistencia al análogo de folato metotrexato (MTX) y el nivel de resistencia aumenta con el número de copias del gen de dhfr (Alt *et al.*, 1978). La utilidad de la selección por MTX se potencia por la disponibilidad de líneas celulares CHO que son deficientes en dhfr (Urlaub y Chasin, 1980).

Un experto en la materia puede construir vectores de expresión para las muteínas de cisteína de EPO que incorporan el gen de dhfr murino en el vector de expresión de pCDNA3.1 disponible en el mercado (Invitrogen), que incluye el gen de fosfotransferasa de neomicina (NPT) que confiere resistencia a G418. El vector de expresión de dhfr murino pdhfr2.9 está disponible de la colección americana de cultivos tipo (catálogo N° 37165). Este gen de dhfr es seleccionable en líneas celulares CHO dhfr⁻ y puede amplificarse por selecciones convencionales para resistencia a MTX (Crouse *et al.* 1983). La secuencia codificante de dhfr puede escindirse de pdhfr2.9 como un fragmento *Bgl* II de aproximadamente 900 pb y clonarse en el sitio *Bam* HI único del poliligador del vector de expresión pREP4 (Invitrogen). Esta construcción situará el gen cadena abajo del promotor de RSV fuerte, que se sabe que actúa en células CHO (Trill *et al.*, 1995) y cadena arriba de un sitio de poliadenilación derivado de SV40. El casete de expresión de dhfr puede escindirse después de pREP4 como un fragmento *Sal* I puesto que los sitios *Sal* I flanquean estrechamente el promotor y el sitio de adición de poliA. Usando enlazadores oligonucleotídicos este fragmento de

50

Sal I puede clonarse en el sitio *Bgl* II único de pCDNA3.1.

Para expresión en células de mamífero tales como células COS o CHO, los ADNc de muteína de cisteína de EPO pueden modificarse por mutagénesis basada en PCR. En el extremo 5' puede añadirse una secuencia consenso Kozak antes del codón ATG iniciador de la traducción para potenciar la traducción en células de mamífero. En el extremo 3', el enlazador y las secuencias de FLAG pueden retirarse y restaurarse la secuencia codificante natural y la señal de terminación de traducción. Estos ADNc de EPO modificados pueden clonarse después como fragmentos *Bam* HI - *Eco* RI en el poliligador de pCDNA3.1 para experimentos de transfección transitoria o en el poliligador del vector pCDNA3.1::dhfr para expresión estable en células de mamífero. Para expresión en células de mamífero, los genes de EPO mutantes que codifican las muteínas de cisteína se modificarían en el extremo 5' para incorporar una secuencia consenso de Kozak (GCCACC) inmediatamente antes del codón ATG iniciador de la traducción para potenciar la traducción en células de mamífero. En el extremo 3' el enlazador y las secuencias de FLAG se retirarían y se restauraría la secuencia codificante natural. Estas modificaciones podrían conseguirse por una diversidad de técnicas de mutagénesis que se conocen bien por los expertos en la materia. Podrían emplearse procedimientos de mutagénesis basados en PCR basados en los descritos en los Ejemplos 4 y 17. Podrían usarse cebadores de PCR BB302 (5> CGCGGATCCGCCACCATGGGGTGCAC GAATGTCCT >3) (SEC ID N°: 47) y BB303 (5>CGCGAATTCTCATCTGTCCCCTGTCCTGCAGCC >3) (SEC ID N°: 48) para realizar PCR de los genes de EPO mutados clonados en pUC19 o pBlueBac4.5 como moldes. El cebador directo BB302 hibrida con la secuencia génica de EPO que codifica los primeros siete aminoácidos de la señal de secreción de EPO, añade una secuencia consenso de Kozak, GCCACC, inmediatamente antes del codón ATG iniciador de la traducción e incluye un sitio *Bam* HI para fines de clonación. El cebador inverso BB303 hibrida con secuencias que codifican los siete aminoácidos carboxi terminales de la secuencia codificante de EPO, añade un codón de parada de la traducción TGA después de la secuencia codificante de EPO e incluye un sitio *Eco* RI para fines de clonación. Los productos de las reacciones de PCR individuales que usan esos cebadores y cualquier molde de gen de EPO mutante que tenga una mutación entre estos dos cebadores, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos 1 a 159 de la secuencia codificante de EPO madura, producirán productos de PCR que pueden purificarse, digerirse con *Bam* HI y *Eco* RI y clonarse en un vector adecuado para expresión en células de mamífero tales como pCDNA3.1(+) (Invitrogen). También podrían usarse los cebadores de PCR 302 y 303 para modificar las muteínas de cisteína de EPO en las que se añade un resto de cisteína antes del primer aminoácido, A1, de la secuencia codificante de EPO madura, pero distal a la secuencia señal de EPO. Las mutaciones en la secuencia de EPO que codifican los siete aminoácidos carboxi terminales, o la mutación *167C descrita en el Ejemplo 17, requerirían el uso de cebadores inversos alternativos en lugar de BB303. Estos cebadores se diseñarían individualmente para incluir el codón de cisteína mutado, al menos 21 nucleótidos en el extremo 3' del oligo que coinciden exactamente con la diana del molde y el sitio de *Eco* RI para fines de clonación. Por ejemplo podría usarse el cebador inverso BB304 (5> CGCGAATTCTCAACATCTGTCCCCTGTCCTG CAGCC >3) (SEC ID N°: 49) y BB302 en una reacción de PCR con el gen de *167C de EPO mutado clonado en pUC19 o pBlueBac4.5 como molde para generar un gen de EPO mutante modificado que codifica la muteína *167C que sería adecuada para expresión en sistemas de expresión de células de mamífero.

Se prefieren ADN plasmídicos sin endotoxinas para transfectar célula de mamífero tales como células COS o CHO dhfr⁻. Pueden obtenerse líneas celulares de CHO dhfr⁻ de varias fuentes tales como el Dr. L. Chasin en la Universidad de Columbia (CHO K1 DUKX B 11) o de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CHO duk⁻, ATCC N° CRL-9096). Las células pueden cultivarse en medio F12/DMEM complementado con FBS 10 %, glutamina, glicina, hipoxantina y timidina (Lucas *et al.*, 1996). Pueden llevarse a cabo transfecciones por electroporación o usando reactivos de transfección bien conocidos por los expertos en la materia tales como LipofectAMINE (Gibco BRL), usando los protocolos del proveedor y/o los descritos en la bibliografía (Kaufman, 1990). Pueden seleccionarse transfectantes dhfr⁻ en F12/DMEM complementado con FCS dializado al 7 % y sin glutamina, glicina, hipoxantina y timidina (Lucas *et al.*, 1996). Como alternativa puede seleccionarse con respecto a resistencia a G418 (codificada por el gen NPT de pCDNA3.1) y posteriormente explorar transfectantes con respecto al fenotipo dhfr⁺. Los clones de dhfr⁺ pueden expandirse en medio de selección y los sobrenadantes de cultivo explorarse con respecto a producción de muteína de cisteína de EPO usando los kits de ELISA de EPO disponibles en el mercado (disponibles de R & D Systems) o por transferencia de Western usando antisuero anti-EPO (disponible de R&D Systems). Después pueden agruparse los clones que expresan la muteína de cisteína de EPO y someterse a múltiples ciclos de selección para resistencia a MTX a concentración de fármacos creciente como se describe en Kaufman (1990). Después de cada ciclo de selección de MTX, los clones individuales pueden ensayarse con respecto a producción de muteína de cisteína de EPO. Estos procedimientos se describen bien en la bibliografía y se han usado para expresar una diversidad de proteínas heterólogas en células CHO (revisado en Kaufman, 1990).

Preferentemente, los medios usados para cultivar las células CHO que expresan las muteínas de cisteína de EPO deberían contener cistina u otro agente de bloqueo de cisteína. Las muteínas de cisteína de EPO pueden purificarse del medio condicionado de células CHO usando protocolos similares a los descritos por Imai *et al.* (1990). Después de la retirada de las células CHO por centrifugación, las muteínas de cisteína de EPO pueden purificarse del sobrenadante por cromatografía de columna usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Las etapas de cromatografía de columna empleadas para la purificación de las muteínas de cisteína de EPO podrían incluir cromatografía de Blue Sepharose, hidroxipatita, de fase inversa, de interacción hidrófoba, de exclusión de tamaño y de intercambio iónico.

EJEMPLO 20

Clonación, Expresión y Purificación de IFN- α 2.5 A. Clonación de secuencias de ADN que codifican IFN- α 2.

Hay al menos 25 genes de IFN- α distintos que codifican proteínas que comparten el 70 % o más de identidad de aminoácidos (Blatt *et al.*, 1996). Debido al alto grado de homología de secuencia de ADN entre las especies de IFN- α , el gen de IFN- α 2 se clonó en dos etapas. Primero, se amplificó el gen de IFN- α 2 por PCR de ADN genómico humano usando cebadores correspondientes a secuencias únicas cadena arriba y cadena abajo del gen de IFN- α 2. Este producto de PCR se clonó y secuenció para confirmar que codifica el gen de IFN- α 2. Posteriormente, la secuencia codificante de IFN- α 2 se modificó por PCR y se subclonó para expresión en *E. coli* y mutagénesis dirigida. Se amplificó ADN que codificaba IFN- α 2 por PCR de ADN genómico humano (CLONTECH). Se llevaron a cabo reacciones de PCR con BB93 (5>CGCGAATTCGGATATGTAAA TAGATA-CACAGTG>3) (SEC ID N°: 50) y BB94 (5>CGCAAGCTTAAAGATTTAAATCGTGTGCATGGT>3) (SEC ID N°:51). BB93 hibrida con secuencias genómicas aproximadamente 300 pb cadena arriba (es decir hacia 5') de la secuencia codificante de IFN- α 2 y contiene un sitio *Eco* RI para fines de clonación. BB94 hibrida con secuencias genómicas aproximadamente 100 pb cadena abajo (es decir hacia 3') de la secuencia codificante de IFN- α 2 y contiene un sitio *Hind* III para fines de clonación. El producto de PCR de aproximadamente 1 kb resultante se digirió con *Eco* RI y *Hind* III y se clonó en pCDNA3.1(+) digerido de forma similar y tratado con fosfatasa alcalina (Invitrogen). Se identificó un clon que tenía la secuencia de ADN correcta para IFN- α 2 (Henco *et al.*, 1985) y se designó pBBT160.

Para expresión citoplásmica en *E. coli* se modificó el gen de IFN- α 2 clonado de pBBT160 por PCR para incorporar un codón de metionina inmediatamente antes del primer resto (C1) de la proteína de IFN- α 2 madura. Se añadió un codón de parada TAA después del resto carboxi terminal, E165. A la vez, se añadieron sitios *Xba* I y *Sal* I y se eliminó un sitio *Bgl* II para proporcionar sitios de restricción convenientes para mutagénesis posterior. En esta reacción se usó pBBT160 como molde y se amplificó por los cebadores BB99 5>CGCAAGCTTCATATGTGTGATCTGCCTCAAAC-CCACAGCCTG GGTTCTAGAAGGACCTTGATGCTC>3) (SEC ID N°: 52) y BB100 (5>CGCGAATTCTTATT CCTTACTTCTTAACTTTCTTGCAAGTTTGTGCGACAAAGAAAAGGATCTCATGAT>3) (SEC ID N°: 53). BB99 hibrida con el extremo 5' de la secuencia codificante de IFN- α 2 madura y codifica una metionina iniciadora antes del primer aminoácido de IFN- α 2 maduro. BB99 introduce un sitio *Xba* I de aproximadamente 30 pb cadena abajo del ATG iniciador, pero la secuencia de aminoácidos de la proteína no está alterada. Se incluyeron un sitio *Hind* III y un sitio *Nde* I, que solapa con el ATG, para fines de clonación. El cebador inverso, BB 100, hibrida con el extremo 3' de la secuencia codificante y añade un codón de parada TAA. BB 100 introduce un sitio *Sal* I de aproximadamente 30 pb cadena arriba del codón TAA y elimina un sitio *Bgl* II de origen natural localizado aproximadamente 15 pb más corriente arriba. Como resultado, el sitio *Bgl* II de origen natural localizado aproximadamente 185 pb cadena abajo del iniciador ATG se convierte en un sitio único. Ninguna de estas alteraciones cambió la secuencia de aminoácidos. Se añadió un sitio *Eco* RI inmediatamente cadena abajo del codón de parada para fines de clonación. El producto de PCR de aproximadamente 520 pb se digirió con *Hind* III y *Eco* RI, se purificó en gel y se clonó en el plásmido digerido de forma similar pCDNA3.1(+). Se determinó que un clon tenía la secuencia de ADN correcta. Este plásmido se designó pBBT164. Para expresión citoplásmica en *E. coli*, el fragmento *Nde* I - *Eco* RI de aproximadamente 520 pb de pBBT164 se clonó en vector de expresión digerido de forma similar, pCYB1, (New England Biolabs). El vector plasmídico pCYB1 permite que los genes se expresen como proteínas no fusionadas o como proteínas de fusión; esta construcción se creó de modo que la proteína se exprese como una proteína no fusionada. El plásmido resultante se denominó pBBT170 y codifica met-IFN- α 2. El fragmento *Nde* I - *Eco* RI de pBBT164 que contiene la secuencia met-IFN- α 2 también se subclonó en pUC18 digerido con *Nde* I-*Eco* RI para generar el plásmido pBBT168.

IFN- α 2 también puede expresarse en una forma activa en *E. coli* por secreción en el espacio periplásmico (Voss *et al.*, 1994). IFN- α 2 secretado carece de una metionina N-terminal y tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a IFN- α 2 de origen natural. Para expresar una forma secretada de IFN- α 2, la secuencia líder del gen de enterotoxina estable al calor de *E. coli* (STII) (Picken *et al.*, 1983) se fusionó con la secuencia codificante para IFN- α 2 maduro mediante PCR. Debido a su longitud, la secuencia de STII se añadió en dos reacciones de PCR secuenciales. La primera reacción usó el cebador directo BB101 (5>GCATCTATGTT CGTTTTCTCTATCGCTACCAACGCTTACGCATGTGATCT GCCTCAAACCCAC AGC>3) (SEC ID N°: 54) y cebador inverso BB100 con pBBT164 (descrito anteriormente) como molde. El extremo 3' (21 pb) de BB101 hibrida con el extremo 5' de la secuencia codificante de IFN- α 2 maduro. El segmento 5' (39 nucleótidos) de BB101 codifica una parte del péptido líder de STII. El producto de PCR de aproximadamente 550 pb de esta reacción se purificó en gel y se usó como molde para la segunda reacción de PCR. La segunda reacción de PCR usó cebador inverso BB100 y cebador directo BB11 (5'-CCCCCTCTAGACA TAT-GAAG AAGAACATCGCATTCTGCTGGCAT CTATGTTTCGTTTTCTC TATCG-3') (SEC ID N°: 7). BB11 añade el resto del péptido líder de STII y contiene un sitio *Nde* I que solapa con el ATG iniciador del líder STII. El producto de aproximadamente 590 pb de esta reacción se digirió con *Nde* I y *Xba* I. El fragmento *Nde* I *Xba* I de aproximadamente 100 pb que contenía la secuencia líder STII y

aproximadamente 30 pb amino terminales de IFN- α 2, se purificó en gel y se ligó con pBBT168 [pUC18::met-IFN- α 2] que se había digerido con *Nde* I y *Xba* I, tratado con fosfatasa alcalina y purificado en gel. En esta etapa el segmento amino terminal *Nde* I-*Xba* I de aproximadamente 30 pb del gen de met-IFN- α 2 se reemplaza con el segmento amino terminal *Nde* I-*Xba* I de aproximadamente 100 pb derivado de PCR del producto de PCR STII-IFN- α 2. La secuencia de la construcción pUC18::STII-IFN- α 2 resultante se confirmó y ese plásmido se designó pBBT177. Para expresión en *E. coli*, pBBT177 se digirió con *Nde* I y *Eco* RI y el fragmento de aproximadamente 570 pb que contenía el gen de STII-IFN- α 2 se purificó en gel y se clonó en el vector de expresión pCYB1 bajo el control del promotor de tac. El plásmido resultante se designó pBBT178.

10 B. Expresión de rIFN- α 2 en *E. coli*.

pBBT170, que codifica met-IFN- α 2, y el vector parental, pCYB1, se transformaron en *E. coli* JM109. Los experimentos con estas cepas dieron como resultado la expresión de met-IFN- α 2. Es preferible IFN- α 2 secretado a met-IFN- α 2 citoplásmico porque IFN- α 2 secretado tiene la misma secuencia de aminoácidos que IFN- α 2 de origen natural.

Para expresión de rIFN- α 2 secretado, se transformó pBBT178 [pCYB1::STII-IFN- α 2] y el vector parental pCYB1 en *E. coli* W3110. Las cepas resultantes se designaron BOB202: W3110 (pBBT178) y BOB130: W3110 (pCYB1). Los inventores realizaron una serie de experimentos que ensayaban el crecimiento y la expresión de rIFN- α 2 de BOB202 en medio LB tamponado con fosfato o MES a pH iniciales que variaban de 5,0 a 7,0. Los cultivos de una noche saturados se diluyeron a DO aproximadamente 0,025 a A_{600} en LB tamponado que contenía ampicilina 100 μ g/ml y se incubaron a 37 °C en matraces de agitación. Cuando las O.D. de cultivo alcanzaron aproximadamente 0,3-0,5, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión de rIFN- α 2. Para los experimentos iniciales, se tomaron muestras de los cultivos a 0, 1, 3, 5 y aproximadamente 16 horas después de la inducción. Se analizaron muestras de cultivos inducidos y no inducidos por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de Tris-glicina 14 % prefabricados teñidos con Azul de Coomassie. Además de la forma procesada de aproximadamente 19 kDa esperada de IFN- α 2, los inventores observaron una forma de peso molecular mayor del esperado (aproximadamente 21,5 kDa) de la proteína. La forma de mayor peso molecular podría resultar de falta de procesamiento proteolítico del péptido líder de STII; el peso molecular del péptido líder es coherente con esta hipótesis. Los resultados de los inventores indicaron que un pH inferior potenció la acumulación de la banda de rIFN- α 2 de tamaño correcto. Los inventores observaron que a o por encima de pH 6,5 la forma de 21,5 kDa era predominante, mientras que a o por debajo de pH 6,0 una banda de aproximadamente 19 kDa, que migraba conjuntamente con un patrón de rIFN- α 2 expresado en *E. coli* (Endogen, Inc.), era la forma predominante de la proteína. A o por debajo de pH 6,0, la banda de 19 kDa suponía al menos el 80 % y probablemente más del 90 % del IFN- α 2 expresado por las células de *E. coli*. Basándose en estos hallazgos, los experimentos de expresión adicionales usaron medio LB tamponado con MES 100 mM a un pH de 5,5. Voss *et al.* (1994) también indicaron secreción de IFN- α 2 al periplasma de *E. coli* usando la secuencia líder de STII. También observaron que la proporción de rIFN- α 2 presente en la banda de 21,5 kDa se redujo y la proporción que migraba a 19 kDa aumentó cuando el pH de cultivo se mantuvo a 6,7 en comparación con 7,0. A pH 7,0 Voss *et al.* (1994) indicaron que 10-30 % de la proteína de fusión STII:IFN- α 2 se procesaba para producir la proteína IFN- α 2 madura de 19 kDa. El porcentaje de proteína IFN- α 2 de 19 kDa procesada de forma correcta podría aumentarse a 50-60 % cultivando la *E. coli* a pH 6,7. Sin embargo, incluso a este pH, una cantidad sustancial (40-50 %) de la proteína de fusión STII: IFN- α 2 permanecía sin procesar, reduciendo el rendimiento de IFN- α 2 de 19 kDa procesada de forma correcta. Voss *et al.* (1994) sugirieron que el pH 6,7 era óptimo para maximizar la cantidad de rIFN- α 2 secretada que migra a 19 kDa. Voss *et al.* (1994) variaron varios parámetros de crecimiento para intentar aumentar el porcentaje de proteína IFN- α 2 de 19 kDa procesada de forma correcta a más de 50-60 %, pero no tuvieron éxito. Los datos de los inventores indican que la reducción del pH a menos de 6,5, y preferiblemente de 5,5 a 6,0, maximiza la relación de producto de rIFN- α 2 escindido (19 kDa) con no escindido (21,5 kDa). A estos pH menores, el porcentaje de IFN- α 2 de 19 kDa procesado de forma correcta aumenta a al menos 80 % y probablemente 90-100 % del IFN- α 2 total sintetizado por las células.

Los cultivos que expresaban rIFN- α 2 se sometieron a choque osmótico basándose en el procedimiento de Koshland y Botstein (1980). Este procedimiento rompe la membrana exterior de *E. coli* y libera los contenidos del periplasma al medio circundante. La centrifugación posterior separa los componentes periplásmicos solubles (recuperados en el sobrenadante) de componentes citoplásmicos, periplásmicos insolubles y asociados a células (recuperados en el sedimento). Aproximadamente 25-50 % del rIFN- α 2 de 19 kDa sintetizado por BOB202 se recuperó en el sobrenadante. No se observó nada de la forma de 21,5 kDa de rIFN- α 2 se observó en la fracción periplásmica soluble.

60 C. Expresión y Purificación a Gran Escala de rIFN- α 2 en *E. coli*:

Para purificar la proteína rIFN- α 2 de tipo silvestre, se inocularon cultivos de una noche saturados nuevos de BOB202 a DO aproximadamente 0,02 a A_{600} en MES 100 mM de LB (pH 5,5) que contienen ampicilina 100 μ g/ml. Típicamente, se dejó crecer un cultivo de 325 ml en un matraz de agitación de 2 litros a 37 °C en un baño de agua en agitación giratorio a aproximadamente 160-200 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad de DO de

aproximadamente 0,3 – 0,4, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos inducidos se incubaron después durante aproximadamente 16 horas. Los cultivos se sometieron a choque osmótico basándose en el procedimiento de Hsuing *et al.* (1986). Las células se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron a DO aproximadamente 25/ml en sacarosa 20 % helada, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0). Las células resuspendidas se

- 5 incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 9500 x g durante 10 minutos. Los sedimentos se resuspendieron después en Tris-HCl 10 mM helado pH 8,0, se incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 9500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante (el lisado de choque osmótico) se procesó inmediatamente o se almacenó a -80 °C.
- 10 rIFN- α 2 se purificó como sigue. El pH del sobrenadante del choque osmótico se ajustó a 3, se centrifugó para retirar cualquier precipitado y se cargó en una columna de S-Sepharose HiTrap de Pharmacia equilibrada en MES 20 mM a pH 5,0 (tampón A). Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente salino lineal de tampón B 0-100 % (NaCl 500 mM, MES 20 mM, etilenglicol 10 %). Las fracciones de columna se analizaron por SDS-PAGE no reductor. rIFN- α 2
- 15 eluyó a NaCl aproximadamente 225-235 mM. Las fracciones que se enriquecieron con respecto a rIFN- α 2 se agruparon y se fraccionaron adicionalmente en una columna Hi Trap de IMAC (Cromatografía de Afinidad Metálica Inmovilizada) de Cu⁺⁺ de 1 ml previamente equilibrada en fosfato sódico 40 mM pH 6,0, NaCl 1 M, Tween 20 0,1 %.
- 20 Se eluyó rIFN- α 2 con un gradiente de pH inverso de 5,5 a 4,1 en fosfato sódico 40 mM, NaCl 1 M, Tween 20 0,1 %. rIFN- α 2 se eluyó después de que el gradiente alcanzara tampón B 100 %, cuando el pH del eluato alcanzó finalmente pH 4,1. Las fracciones de la columna de IMAC de Cu⁺⁺ que contenía rIFN- α 2 purificado plegado de forma
- 25 apropiada se agruparon y almacenaron como alícuotas congeladas a -80 °C. Una variante menor de rIFN- α 2 fue detectable en algunas de las fracciones que eluían antes. Esta variante, que resultó de formación de disulfuro incompleta y es biológicamente activa, se ha descrito previamente (Khan y Rai, 1990). Las fracciones que contienen esta variante no se añadieron al grupo final de rIFN- α 2 purificado. El rendimiento final de rIFN- α 2, según se determinó por absorbancia a 280 nm y por análisis de Bradford, fue de aproximadamente 400 μ g de 250 ml de cultivo. IFN- α 2 reducido migra con un peso molecular aparente ligeramente mayor que IFN- α 2 no reducido cuando se analizó por SDS-PAGE (Morehead *et al.*, 1984). Este cambio de peso molecular aparente se debe a la reducción de los disulfuros nativos en IFN- α 2. El rIFN- α 2 de los inventores migró conjuntamente con el patrón de rIFN- α 2 comercial en condiciones tanto reductoras como no reductoras.

30 D. Bioactividad *In Vitro* de rIFN- α 2 de Tipo Silvestre.

- La bioactividad de IFN- α puede medirse usando ensayos antivirales *in vitro* o ensayos de inhibición de proliferación celular. Los inventores desarrollaron un ensayo de inhibición de crecimiento celular para medir la bioactividad de rIFN- α 2 de tipo silvestre. La línea celular humana Daudi B (Colección Americana de Cultivos Tipo) es sensible a las
- 35 propiedades inhibitorias de crecimiento de IFN- α y se usa de forma rutinaria para medir la bioactividad de IFN- α (Horoszewicz *et al.*, 1979; Evinger y Pestka, 1981). Las células Daudi se mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con FBS 10 %, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 μ g/ml. Para bioensayos, las células se lavaron tres veces con medio RPMI 1640 y se resuspendieron a una concentración de 4 x 10⁵ células/ml en medio RPMI 1640 que contenía FBS 10 %, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 μ g/ml. Se separaron en alícuotas
- 40 50 μ l (2 x 10⁴ células) de la suspensión celular por pocillo de ensayo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano. Se prepararon diluciones de 3 veces en serie de las muestras de proteína a ensayar en medio RPMI 1640 que contenía FBS 10 %, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50 μ g/ml. Se añadieron 50 μ l de las muestras de proteína diluidas a los pocillos de ensayo y las placas se incubaron a 37 °C en un incubador de cultivo tisular de CO₂ 5 % humidificado. Las muestras proteicas se ensayaron en pocillos por triplicado. Después de 4 días,
- 45 se añadieron 20 μ l de CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega Corporation) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C en el incubador de cultivo tisular durante 1-4 horas. La absorbancia se leyó a 490 nm usando un lector de microplacas. Los pocillos de control contenían medio pero no células. Los valores de absorbancia medios para los pocillos de control por triplicado se restaron de los valores medios obtenidos de cada conjunto de pocillos de ensayo por triplicado. Se analizaron diluciones en serie de rIFN- α 2 expresados en *E. coli* (Endogen, Inc.) en paralelo. Las CI₅₀ (la concentración de proteína requerida para inhibición de la mitad del crecimiento máximo) se calcularon para cada muestra y se usaron para comparar bioactividades de las proteínas.
- 50

- La proliferación de la línea celular Daudi se inhibe fuertemente por rIFN- α 2, como se demuestra por una reducción dependiente de dosis de los valores de absorbancia. rIFN- α 2 comercial (Endogen) y rIFN- α 2 de tipo silvestre
- 55 preparado por los inventores alcanzaron el mismo nivel máximo de inhibición del crecimiento, dentro del error del ensayo y tuvieron CI₅₀ medias similares de 13-16 μ g/ml (Tabla 4). Los valores de CI₅₀ para estas proteínas variaron de 7 a 29 pg/ml en ensayos realizados en días diferentes (Tabla 4); por lo tanto se realizaron comparaciones entre proteínas en muestras analizadas el mismo día.

EJEMPLO 21

Construcción, Expresión, Purificación y Bioactividad de Muteínas de Cisteína de IFN- α 2A. Construcción de Muteínas de Cisteína de IFN- α 2.

5 Se construyeron diecisiete mutantes de genes de IFN- α 2 usando procedimientos de mutagénesis basada en PCR dirigida similares a los descritos en el Ejemplo 4. Los inventores construyeron una muteína en la región terminal proximal a la hélice A [Q5C], seis muteínas en el bucle A-B [N45C, Q46C, F47C, Q48C, A50C y 43C44 (una inserción de una cisteína entre los restos 43 y 44); una muteína [D77C] en el bucle BC de dos restos; cuatro
10 muteínas en el bucle CD [Q101C, T106C, E107C, y T108C]; tres muteínas en la región carboxi terminal distal a la hélice E [S163C, E165C y *166C (la adición de un resto de cisteína al extremo carboxi terminal natural)]. Los inventores también construyeron muteínas C1S y C98S, que eliminan el disulfuro C1-C98 de origen natural, pero no esencial, (Lydon *et al.*, 1985; Morehead *et al.*, 1994). La sustitución C1S en la región amino terminal proximal a la hélice A genera una cisteína libre en la hélice C (C98), mientras que la sustitución C98S en la hélice C genera una
15 cisteína libre en la región proximal a la hélice A (C1).

Para mutagénesis, se diseñaron oligonucleótidos cebadores de PCR para incorporar cambios de nucleótidos que dieron como resultado la incorporación de un resto de cisteína en la posición seleccionada dentro de la secuencia codificante de IFN- α 2. Cuando fue factible, el oligo mutagénico también se diseñó para abarcar un sitio de restricción cercano que podría usarse para clonar el fragmento de PCR mutado en un plásmido apropiado. Cuando no se localizó sitio de restricción útil suficientemente cerca de la posición de la mutación, se empleó la técnica de "mutagénesis por extensión de solapamiento" (Horton *et al.*, 1993). El molde usado para las reacciones de PCR mutagénicas fue el plásmido pBBT177 (descrito en el Ejemplo 20) en el que se clona el gen de STII-IFN- α 2 como un fragmento *Nde* I - *Eco* RI en pUC 18. Los productos de PCR se digirieron con endonucleasas de restricción
20 apropiadas, se purificaron en gel y se ligaron con ADN del vector pBBT177 que se había cortado con las mismas enzimas de restricción, se trataron con fosfatasa alcalina y se purificaron en gel. Los transformantes de estas ligaciones se cultivaron y los ADN plasmídicos se aislaron y secuenciaron. La secuencia del fragmento de PCR mutado clonado completo se determinó para verificar la presencia de la mutación de interés y la ausencia de cualquier mutación adicional que pudiera potencialmente introducirse por la reacción de PCR o por los cebadores oligonucleotídicos sintéticos.
30

La mutación de sustitución Q5C se construyó usando la técnica de "mutagénesis por extensión de solapamiento" como se ha descrito en el Ejemplo 4. Las reacciones de PCR iniciales o "primarias" para la construcción de Q5C se realizaron en un volumen de reacción de 50 μ l en tampón de PCR Promega 1X que contenía MgCl₂ 1,5 mM, cada
35 cebador a 0,2 μ M, cada uno de dATP, dGTP, dTTP y dCTP a 200 μ M, 1 ng de plásmido molde pBBT177 (descrito en el Ejemplo 20), 1,5 unidades de Taq Polimerasa (Promega) y 0,25 unidades de Pfu Polimerasa (Stratagene). Las reacciones se realizaron en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). El programa de la reacción implicó: 96 °C durante 3 minutos, 25 ciclos de [95 °C durante 1 minutos, 60 °C durante 1,25 minutos, 72 °C durante 1 minuto] seguido de un mantenimiento a 6 °C. Los pares de cebadores usados fueron [BB125 x BB130] y [BB126 x
40 BB129]. BB125 (5' CTATGC GGCATCAGAGCAGATA >3) (SEC ID N°: 55) hibrida con la secuencia del vector pUC18 aproximadamente 20 pb cadena arriba de la secuencia de IFN- α 2 clonada. BB126 (5' TGTGGAATTGTGAGCGGATAAC >3) (SEC ID N°: 56) hibrida con la secuencia del vector pUC18 aproximadamente 40 pb cadena debajo de la secuencia de IFN- α 2 clonada. BB129 y BB130 son oligonucleótidos mutagénicos complementarios que cambian el codón CAA para Q5 a un codón TGT para cisteína. La secuencia de BB129 es (5' TGTGATCTGCCTTGTACCCACAGCCTG >3) (SEC ID N°: 57) y la secuencia de BB130 es (5' CAGGCTGT
45 GGGTACAAGGCAGATCAC >3) (SEC ID N°: 58). Las reacciones de PCR [BB125 x BB130] y [BB126 x BB129] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 140 pb para [BB125 x BB130] y aproximadamente 560 pb para [BB126 x BB129]. Los productos de PCR se "limpiaron" usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor, se ejecutaron en un gel de agarosa 2 %, se purificaron en gel usando un Kit de Extracción en Gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor y se recuperaron en 20 μ l de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5). Estos dos fragmentos mutados se "cortaron y empalmaron" juntos en la reacción de PCR posterior o "secundaria". En esta reacción se usaron 2 μ l de cada uno de los productos de PCR purificados en gel de las reacciones primarias como molde y BB125 y BB126 se usaron como cebadores. El volumen de reacción fue de 100 μ l y se emplearon 2,5 unidades de Taq Polimerasa y 0,5 unidades de Pfu Polimerasa. Por lo demás, las condiciones de reacción fueron idénticas a las usadas en las reacciones primarias. Se analizó una alícuota de la PCR secundaria por electroforesis en gel de agarosa y se observó la banda esperada de aproximadamente 670 pb. El volumen de la reacción de PCR secundaria se "limpió" usando la Purificación por PCR QIAquick (Qiagen), se digirió con *Nde* I y *Xba* I (New England BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se "limpió" usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick y se ejecutó en un gel de agarosa 2 %. El fragmento *Nde* I
60 - *Xba* I de aproximadamente 100 pb de interés se purificó en gel usando un Kit de Extracción en Gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Este fragmento se ligó con pBBT177 (descrito en el Ejemplo 20) que se había cortado con *Nde* I y *Xba* I, se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (New England BioLabs) y se purificó en gel. La reacción de ligación se usó para transformar *E. coli* y los plásmidos de transformantes resultantes se secuenciaron para identificar un clon que contenía la mutación Q5C y que tenía la secuencia correcta

a lo largo del segmento *Nde* I - *Xba* I de aproximadamente 100 pb.

La mutación de sustitución C1S se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para Q5C excepto que los cebadores mutagénicos complementarios BB128 (5> AGGCAGATC
 5 AGATGCGTAAGC >3) (SEC ID N°: 59) y BB127 (5> GCTTACGCATCTGATCTGCCT >3) (SEC ID N°: 60), que cambian el codón TGT para C1 a un codón TCT para serina, reemplazaron BB130 y BB129 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB1128] y [BB126 x BB127] proporcionaron productos del tamaño esperado: aproximadamente 120 pb para [BB125 x BB128] y aproximadamente 570 pb para [BB 126 x BB127].

10 La mutación de sustitución N45C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para Q5C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB134 (5> CTTTTG GAACT-GGCAGCCAAACTCCTC >3) (SEC ID N°: 61) y BB133 (5> GAGGAGTTTGGCTGCCAGTTCCAAAAG >3) (SEC ID N°: 62), que cambian el codón AAC para N45 a un codón
 15 TGC para cisteína, reemplazaron BB130 y BB129 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB134] y [BB126 x BB 133] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 255 pb para [BB125 x BB134] y aproximadamente 440 pb para [BB126 x BB133]. El producto de la reacción de PCR secundaria se "limpió" usando la Purificación de PCR QIAquick (Qiagen), se digirió con *Bgl* II y *Xba* I (New England BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se "limpió" usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick y se ejecutó en un gel de agarosa 2 %. El fragmento *Bgl* II - *Xba* I de aproximadamente 155 pb de interés se purificó en gel usando un Kit de Extracción en Gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Este fragmento se ligó con pBBT177 que se había cortado con *Bgl* II y *Xba* I, se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (New England BioLabs) y se purificó en gel. La reacción de ligación se usó para
 20 transformar *E. coli* y se secuenciaron plásmidos de transformantes resultantes para identificar un clon que contenía la mutación N45C y que tenía la secuencia correcta a lo largo del segmento *Bgl* II - *Xba* I de aproximadamente 155 pb.

La mutación de sustitución F47C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para N45C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB136 (5> TTCAGC CTTTTGGCACTGGTT-GCCAAA >3) (SEC ID N°: 63) y BB135 (5> TTTGGCAACCAGTGCCAAAAGGCTGAA >3) (SEC ID N°: 64), que cambian el codón TTC para F47 a un codón
 30 TGC para cisteína, reemplazaron BB134 y BB133 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB136] y [BB126 x BB135] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 260 pb para [BB125 x BB136] y aproximadamente 435 pb para [BB126 x BB135].

35 La mutación de inserción 43C44 se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para N45C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB132 (5> TTCAGCCTT TTGGCACTGGTT-GCCAAA >3) (SEC ID N°: 65) y BB131 (5> TTTGGCAACCAGTGCCAAAAGGCTGAA >3) (SEC ID N°: 66), que insertan un codón TGC para cisteína entre los codones que codifican los restos aminoacídicos 43 y 44, reemplazaron BB134 y BB133 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB132] y [BB126 x BB131] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 250 pb para [BB125 x BB132] y aproximadamente 445 pb para [BB126 x BB131].

45 La mutación de sustitución Q46C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para N45C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB154 (5> AGCCTT TTGGAACAGTT-GCCAAACTC >3) (SEC ID N°: 67) y BB153 (5> GAGTTTGGCAACTGTTCCAAAAGGCT >3) (SEC ID N°: 68), que cambian el codón CAG para Q46 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB 134 y BB 133 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones primarias se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 2400. El programa de reacción implicó: 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de [95 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto] seguido de 72 °C durante 7 minutos y un mantenimiento a 4 °C. Las reacciones de PCR [BB125 x BB154] y [BB126 x BB153] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 260 pb para [BB125 x BB154] y aproximadamente 440 pb para [BB126 x BB153]. La reacción de PCR secundaria también se realizó en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 2400. Este programa de reacción implicó: 96 °C durante 5 minutos, 25 ciclos de [95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto] y un mantenimiento a 4 °C. Después de digestión con *Bgl* II y *Xba* I, los productos de esta reacción se limpiaron usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick pero no se purificaron en gel antes de la ligación.

60 La mutación de sustitución Q48C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para Q46C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB 156 (5> GGTTTCA GCCTTACAGAACT-GGTTGCC >3) (SEC ID N°: 69) y BB155 (5> GGCAACCAGTTCTGTAAGGCTGAAACC>3) (SEC ID N°: 70), que cambian el codón CAA para Q48 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB 154 y BB 153 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB 156] y [BB126 x BB155] proporcionaron productos de los tamaños esperados:
 65 aproximadamente 265 pb para [BB125 x BB156] y aproximadamente 435 pb para [BB126 x BB155].

La mutación de sustitución A50C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para Q46C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB158 (5> AGGGATGGTTIC**CACT**ITIG-GAACTG >3) (SEC ID N°: 71) y BB157 (5> CAG TTCCAAAAG**TG**TGAAAC CATCCCT >3) (SEC ID N°: 72), que cambian el codón GCT para A50 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB154 y BB153 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB158] y [BB126 x BB157] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 270 pb para [BB125 x BB156] y aproximadamente 440 pb para [BB126 x BB155].

La mutación de sustitución D77C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para Q5C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB138 (5> TAGGAG GGTCTC**ACCA**AG-CAGCAGA >3) (SEC ID N°: 73) y BB137 (5> TCTGCTGCTTGG**TG**TGAGACCCTCCTA >3) (SEC ID N°: 74), que cambian el codón GAT para D77 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB 130 y BB 129 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB138] y [BB126 x BB137] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 350 pb para [BB125 x BB138] y aproximadamente 345 pb para [BB126 x BB137]. El producto de la reacción de PCR secundaria se "limpió" usando la Purificación de PCR QIAquick (Qiagen), se digirió con *Bgl* II y *Sal* I (New England BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se "limpió" usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick y se ejecutó en un gel de agarosa al 2 %. El fragmento *Bgl* II - *Sal* I de aproximadamente 275 pb de interés se purificó en gel usando un Kit de Extracción en Gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Este fragmento se ligó con pBBT177 que se había cortado con *Bgl* II y *Sal* I, se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (New England BioLabs) y se purificó en gel. La reacción de ligación se usó para transformar *E. coli* y se secuenciaron plásmidos de los transformantes resultantes para identificar un clon que contuviera la mutación D77C y que tuviera la secuencia correcta a lo largo del segmento *Bgl* II - *Sal* I de aproximadamente 275 pb.

La mutación de sustitución T106C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para D77C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB 140 (5> CAGGGGAGTCTC**ACAC**AC-CCCCACCCC >3) (SEC ID N°: 75) y BB139 (5> GGGGTGGGGT**GTG**GAGACTCCCCTG >3) (SEC ID N°: 76), que cambian el codón ACA para T106 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB 138 y BB 137 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB 140] y [BB126 x BB 139] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 435 pb para [BB125 x BB140] y aproximadamente 260 pb para [BB126 x BB139].

La mutación de sustitución T108C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para D77C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB142 (5> CTTTCAT CAGGGG**ACT**CT-GTCACCCC >3) (SEC ID N°: 78) y BB141 (5> GGGGTGACAGAG**TG**TCCCCTGATGAAG >3) (SEC ID N°: 79), que cambian el codón ACT para T108 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB 138 y BB 137 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB142] y [BB126 x BB141] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 440 pb para [BB125 x BB142] y aproximadamente 250 pb para [BB126 x BB141].

La mutación de sustitución Q101C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para D77C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB162 (5> CACCCC CACCCC**ACAT**AT-CACACAGGC >3) (SEC ID N°: 80) y BB161 (5> GCCTGTGTGAT**ATG**TGGGGTGGGGGTG>3) (SEC ID N°: 81), que cambian el codón CAG para Q101 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB 138 y BB 137 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones primarias se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 2400. El programa de reacción implicó: 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de [95 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto] seguido de 72 °C durante 7 minutos y un mantenimiento a 4 °C. Las reacciones de PCR [BB125 x BB162] y [BB126 x BB161] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 425 pb para [BB125 x BB162] y aproximadamente 275 pb para [BB126 x BB161]. La reacción de PCR secundaria también se realizó en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 2400. Este programa de reacción implicó: 96 °C durante 5 minutos, 25 ciclos de [95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto] y un mantenimiento a 4 °C. Después de digestión con *Bgl* II y *Sal* I, los productos de esta reacción se limpiaron usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick pero no se purificaron en gel antes de la ligación.

La mutación de sustitución E107C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para Q101C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB164 (5> CAT CAGGGGAGT**ACAT**GT-CACCCCCAC >3) (SEC ID N°: 81) y BB163 (5> GTGGGGGTGACAT**TG**TACTCCCCTG ATG >3) (SEC ID N°: 82), que cambian el codón GAG para E107 a un codón TGT para cisteína, reemplazaron BB 162 y BB161 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB164] y [BB126 x BB163] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 440 pb para [BB125 x BB164] y aproximadamente 255 pb para [BB126 x BB163].

La mutación de sustitución C98S se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para Q101C con las siguientes diferencias. Los cebadores mutagénicos complementarios BB160 (5>

CCC CTGTATCACAGAGGCT-TCCAGGTC >3) (SEC ID N°: 83) y BB159 (5> GACCTGGAAGCCTCTGTGATACA GGGG >3) (SEC ID N°: 84), que cambian el codón TGT para C98S a un codón TGT para serina, reemplazaron BB 162 y BB161 respectivamente en las reacciones de PCR primarias. Las reacciones de PCR [BB125 x BB160] y [BB126 x BB159] proporcionaron productos de los tamaños esperados: aproximadamente 415 pb para [BB125 x BB160] y aproximadamente 285 pb para [BB126 x BB159].

La mutación de sustitución de cisteína S163C se construyó como sigue. El oligonucleótido inverso mutagénico BB 143 (5> CGCGAATTCTTATTCCTTACATCTTAACTTTC >3) (SEC ID N°: 85) se diseñó para cambiar el codón AGT para serina en la posición 163 a un TGT que codifica cisteína y para abarcar el sitio Eco RI cercano. Este oligo se usó en PCR con el cebador directo no mutagénico BB. Se realizó una reacción de PCR de 50 µl en tampón de PCR Promega 1X que contenía MgCl₂ 1,5 mM, cada cebador a 0,2 µM, cada uno de dATP, dGTP, dTTP y dCTP a 200 µM, 1 ng de plásmido molde pBBT131, 1,5 unidades de Taq Polimerasa (Promega) y 0,25 unidades de Pfu Polimerasa (Stratagene). Las reacciones se realizaron en un termociclador Robocycler Gradient 96 (Stratagene). El programa de reacción implicó: 96 °C durante 3 minutos, 25 ciclos de [95 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1,25 minutos, 72 °C durante 1 minuto] seguido de un mantenimiento a 6 °C. Se analizó una alícuota de 5 µl de la reacción de PCR por electroforesis en gel de agarosa y se descubrió que producía un fragmento sencillo del tamaño esperado de aproximadamente 610 pb. El resto de la reacción se "limpió" usando la Purificación de PCR QIAquick (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor, se digirió con *Sal* I y *Eco* RI (New England BioLabs) de acuerdo con los protocolos del proveedor, se precipitó con etanol, se resuspendió en 20 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,5 y se ejecutó en un gel de agarosa 2 %. El fragmento *Sal* I - *Eco* RI de aproximadamente 42 pb de interés se purificó en gel usando un Kit de Extracción en Gel QIAEX II (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Este fragmento se ligó con pBBT132 que se había cortado con *Sal* I y *Eco* RI, se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (New England BioLabs) y se purificó en gel. La reacción de ligación se usó para transformar *E. coli* y se secuenciaron plásmidos de transformantes resultantes para identificar un clon que contuviera la mutación E107C y para tener la secuencia correcta a lo largo del segmento *Sal* I - *Eco* RI de aproximadamente 42 pb.

También se construyó una mutación que añadía una cisteína después del aminoácido carboxi terminal de la secuencia codificante de IFN- α 2. Este mutante, denominado *167C se construyó usando los protocolos descritos anteriormente para la construcción del mutante S163C con las siguientes diferencias. El oligonucleótido inverso mutagénico BB144 (5> CGCGAATTCT-TAACATTCCTTACTTCTTAACTTTC >3) (SEC ID N°: 86) que añade un codón TGT para cisteína entre el codón GAA para E165 y el codón de parada TAA y abarca el sitio *Eco* RI cercano se usó en la reacción de PCR en lugar de BB143.

La mutación de sustitución E165C se construyó y se verificó su secuencia usando los protocolos detallados anteriormente para S163C con las siguientes diferencias. El oligonucleótido inverso mutagénico BB165 (5> CGCGAATTCTTA **CACT**-TACTTCTTAACT >3) (SEC ID N°: 87) que cambia el codón GAA para E165 a un codón TGT para cisteína y abarca el sitio *Eco* RI cercano se usó en la reacción de PCR en lugar de BB143. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 2400. El programa de reacción implicó: 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de [95 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto] seguido de 72 °C durante 7 minutos y un mantenimiento a 4 °C. Después de la digestión con *Eco* RI y *Sal* I, los productos de esta reacción se limpiaron usando la Purificación de PCR QIAquick.

Para expresión en *E. coli* como proteínas secretadas al espacio periplásmico, los genes de STII-IFN- α 2 que codifican las 17 muteínas se escindieron de los derivados de pBBT177 basados en pUC18 como fragmentos *Nde* I - *Eco* RI de aproximadamente 590 pb y se subclonaron en el vector de expresión de pCYB1 que se habían usado para expresar STII-IFN- α 2 de tipo silvestre. Para experimentos de expresión, estos plásmidos se introdujeron en *E. coli* W3110.

Usando procedimientos similares a los descritos en el presente documento, pueden construirse otras muteínas de cisteína de IFN- α 2. Las muteínas de cisteína pueden ser mutaciones de sustitución que sustituyan con cisteína un resto aminoacídico natural en la secuencia codificante de IFN- α 2, mutaciones de inserción que insertan un resto de cisteína entre dos aminoácidos de origen natural en la secuencia codificante de IFN- α 2 o mutaciones de adición que añaden un resto de cisteína antes del primer aminoácido, CI, de la secuencia codificante de IFN- α 2 o añaden un resto de cisteína después del resto aminoacídico terminal, E165, de la secuencia codificante de IFN- α 2. Los restos de cisteína pueden sustituir a cualquier aminoácido o insertarse entre dos aminoácidos cualesquiera, en cualquier lugar de la secuencia codificante de IFN- α 2. Los sitios preferidos para sustituir o insertar restos de cisteína en IFN- α 2 son en la región antes de la hélice A, el bucle A-B, el bucle B-C, el bucle C-D, el bucle D-E y la región distal a la hélice E. Otros sitios preferidos son los primeros o últimos tres aminoácidos de las hélices, A, B, C, D y E. Son restos preferidos en estas regiones para crear sustituciones de cisteína D2, L3, P4, T6, H7, S8, Q20, R22, K23, S25, F27, S28, K31, D32, R33, D35, G37, F38, Q40, E41, E42, F43, G44, K49, T52, N65, S68, T69, K70, D71, S72, S73, A74, A75, D77, E78, T79, Y89, Q90, Q91, N93, D94, E96, A97, G102, V103, G104, V105, P109, M111, K112, E113, D114, S115, K131, E132, K133, K134, Y135, S136, A139, S152, S154, T155, N156, L157, Q158, E159, S160, L161, R162, y K164. Los restos de cisteína también pueden insertarse inmediatamente antes o después de estos aminoácidos. Otro sitio preferido para añadir un resto de cisteína sería delante de CI, a lo que los inventores denominan *-1C.

También pueden construirse muteínas de IFN- α 2 que contengan una cisteína libre sustituyendo con otro aminoácido uno de los restos de cisteína de origen natural en IFN- α 2. El resto de cisteína de origen natural que normalmente forma un enlace disulfuro con el resto de cisteína sustituido está ahora libre. El resto de cisteína no esencial puede reemplazarse con cualquiera de los otros 19 aminoácidos, pero preferiblemente con un resto de serina o alanina.

5 También puede introducirse un resto de cisteína libre en IFN- α 2 por modificación química de un aminoácido de origen natural usando procedimientos tales como los descritos por Sytkowski *et al.* (1998).

Usando procedimientos similares a los descritos en los Ejemplos 20-22, pueden expresarse las proteínas en *E. coli*, purificarse las proteínas, pegarse las proteínas y medirse sus bioactividades en un bioensayo *in vitro*. Las muteínas de IFN- α 2 también pueden expresarse en células eucariotas tales como células de insecto o de mamífero, usando procedimientos similares a los descritos en los Ejemplos 16-20 o procedimientos relacionados bien conocidos por los expertos en la materia.

15 B. Expresión en *E. coli* de Muteínas de Cisteína de rIFN- α 2.

Para evaluar la expresión, se dejaron crecer cultivos de las muteínas de rIFN- α 2 y se indujeron como se ha descrito anteriormente para rIFN- α 2 de tipo silvestre. Típicamente, se dejaron crecer cultivos de 45 ml en matraces de agitación de 250 ml a 37 °C en un baño de agua en agitación giratorio a aproximadamente 180-200 rpm. Los inventores observaron que la aireación vigorosa de cultivos en matraces de agitación da como resultado niveles

20 reducidos de proteína IFN- α 2 en los sobrenadantes de los lisados de choque osmótico. Por lo tanto los inventores usaron de forma rutinaria condiciones que eran subóptimas para aireación pero preferibles para producción de rIFN- α 2 y muteína de rIFN- α 2 soluble. Los cultivos inducidos se incubaron durante aproximadamente 16 horas, se recogieron y se sometieron a choque osmótico como se ha detallado anteriormente para rIFN- α 2 de tipo silvestre con la excepción de que se añadió cistina a una concentración final de 5 mM a los tampones usados para el

25 procedimiento de choque osmótico. Añadir cistina a los tampones de choque osmótico da como resultado propiedades cromatográficas significativamente mejoradas para las dos primeras muteínas analizadas, Q5C y S163C. Las muteínas de interferón no tratadas con cistina eluyeron consistentemente de la columna de S-Sepharose como bandas anchas, que, cuando se analizaron por SDS-PAGE no reductor, mostraron especies de múltiples pesos moleculares en y alrededor del peso molecular del monómero esperado. Estas especies representan

30 más probablemente variantes de interferón plegadas erróneamente o plegadas de forma incompleta. Por el contrario, las muteínas de interferón tratadas con cistina durante el procedimiento de choque osmótico eluyeron de la columna de S-Sepharose como bandas finas, que, cuando se analizaron por SDS-PAGE no reductor, consistían en solamente una especie de interferón que migraba conjuntamente con el patrón de tipo silvestre de interferón. Las recuperaciones de las muteínas de interferón purificadas de la columna de S-Sepharose también fueron de 1,5 a 2

35 veces mayores cuando se incluyó cistina en los tampones de choque osmótico. Basándose en estos resultados, se añadió cistina 5 mM a los tampones de choque osmótico usados para purificar todas las muteínas de cisteína.

El análisis de SDS-PAGE de los sobrenadantes de choque osmótico de las muteínas mostró que la mayoría había reducido (en comparación con el tipo silvestre) los niveles de la banda de rIFN- α 2 de 19 kDa. Dos muteínas, Q5C y S163C, se expresaron a niveles equivalentes a interferón de tipo silvestre y se purificaron fácilmente varios cientos de microgramos de cada una de estas muteínas como se detalla posteriormente. Ocho muteínas (C1S, 43C44, N45C, Q46C, Q48C, A50C, D77C y T108C) fueron esencialmente indetectables en sobrenadantes de choque osmótico. Las siete muteínas restantes (F47C, C98S, Q101C, T106C, E107C, E165C, *166C) se detectaron a

40 diversos niveles reducidos (en comparación con tipo silvestre) en sobrenadantes de choque osmótico. Algunas de estas muteínas (T106C, C98S, E107C y Q101C) se purificaron de sobrenadantes de choque osmótico, pero sólo se recuperaron pequeñas cantidades de las proteínas puras. Ciertas muteínas, C98S, Q101C, T106C, E107C y *166C, se expresaron a niveles relativamente altos pero se acumularon principalmente en una forma insoluble, supuestamente en el periplasma. Estas proteínas migraron conjuntamente con los patrones de rIFN- α 2 de tipo silvestre en condiciones reductoras que indican que el líder de STII se había retirado. Las evaluaciones cualitativas

50 de los niveles de expresión relativos de las muteínas se resumen en la Tabla 4.

C. Purificación de muteínas de cisteína de rIFN- α 2

Para purificar las muteínas de rIFN- α 2, típicamente, se deja crecer un cultivo de 325 ml en un matraz de agitación de 2 litros o un cultivo de 500 ml en un matraz de agitación graduado de 2 litros a 37 °C en un baño de agua en agitación giratorio (New Brunswick Scientific) a aproximadamente 170-220 rpm. Los cultivos se dejaron crecer, se indujeron, se recogieron y se sometieron a choque osmótico como se ha descrito en el Ejemplo 20. Los sobrenadantes de choque osmótico resultantes se procesaron inmediatamente o se almacenaron a -80 °C.

60 Las muteínas de IFN- α 2 solubles en los sobrenadantes de choque osmótico se purificaron usando cromatografía de IMAC de Cu⁺⁺ y S-Sepharose como se ha detallado anteriormente para purificación de rIFN- α 2 de tipo silvestre. Todas las muteínas ensayadas se unieron estrechamente a la columna de cobre y eluyeron en condiciones similares a rIFN- α 2 de tipo silvestre. Estos resultados sugieren que las conformaciones de las muteínas de cisteína son similares a las de rIFN- α 2 nativo, al menos en las regiones que comprenden el bolsillo de unión a metal.

- El análisis de SDS-PAGE no reductor de las muteínas de cisteína purificadas Q5C, C98S, Q101C, T106C, E107C, S163C y *166C mostraron que las muteínas se recuperaron predominantemente como monómeros, que migran al peso molecular esperado de aproximadamente 19 kDa. C98S migró con un peso molecular ligeramente mayor que las otras muteínas de rINF- α 2 debido a la ausencia del enlace disulfuro Cysl-Cys-98. Algunas de las muteínas purificadas contenían pequeñas cantidades de dímeros de rINF- α 2 ligados por disulfuro. Los pesos moleculares de las especies diméricas fueron de aproximadamente 37-38 kDa.

D. Bioactividades de las Muteínas de Cisteína de rINF- α 2.

- Las actividades biológicas de las muteínas de cisteína de rINF- α 2 Q5C y S163C purificadas se midieron en el ensayo de inhibición del crecimiento de Daudi descrito en el Ejemplo 20. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando kits de ensayo de proteína Bradford o BCA (Bio-Rad Laboratories y Pierce). Se analizaron rINF- α 2 de tipo silvestre comercial y rINF- α 2 preparado por los inventores en paralelo los mismos días para controlar con respecto a variabilidad entre días en los ensayos. Las muteínas inhibieron la proliferación de las células Daudi en el mismo grado que las proteínas de control de rINF- α 2 de tipo silvestre, dentro del error del ensayo. La CI_{50} media para la muteína Q5C fue de 13 pg/ml, que es similar a la CI_{50} media de las proteínas de rINF- α de tipo silvestre. La CI_{50} media para la proteína S163C fue de 27 pg/ml. Estos datos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4.

Expresión y Bioactividades <i>in vitro</i> de Muteínas de Cisteína de IFN- α 2					
Proteína IFN- α 2	Localización de la Mutación	Expresión Relativa		CI_{50} Media (pg/ml)	Intervalo de CI_{50} ³ (pg/ml)
		Celular Total ¹	Porcentaje Soluble ²		
rINF- α 2 ⁴	-	-	-	16+/-7	8-29(n=10)
rINF- α 2 ⁵	-	++++	~33	13 +/- 4	7-19 (n=10)
CIS	Región N-terminal ⁶	+/-	0		
Q5C	Región N-terminal	++++	~20	13	9,11,15,18
43C44	Bucle A-B	++	0		
N45C	Bucle A-B	++	0		
Q46C	Bucle A-B	+/-	0		
F47C	Bucle A-B	++++	~5		
Q48C	Bucle A-B	+/-	0		
A50C	Bucle A-B	+/-	0		
D77C	Bucle B-C	+/-	0		
C98S	Hélice C'	+++++ ~5-10			
Q 101C	Bucle C-D	+++++ ~5-10			
T106C	Bucle C-D	+++++ ~5-10			
E107C	Bucle C-D	+++++ ~5-10			
T108C	Bucle C-D	+/-	0		
S163C	Región C-terminal	++++	~33	27 +/- 8	18-40 (n=6)
E165C	Región C-terminal	+++	~20		
*166C	Extremo C-terminal	+++	~20		

Expresión y Bioactividades <i>in vitro</i> de Muteínas de Cisteína de IFN- α 2				
Proteína IFN- α 2	Localización de la Mutación	Expresión Relativa	CI ₅₀ Media (ng/ml)	Intervalo de CI ₅₀ ³
¹ Acumulación relativa de la proteína IFN- α 2 en extractos de célula completa				
² Parte de la proteína IFN- α 2 en el sobrenadante de choque osmótico, estimada de los geles de SDS-PAGE				
³ Valores de CI ₅₀ de experimentos individuales				
⁴ rIFN- α 2 de tipo silvestre comercial (Endogen, Inc.)				
⁵ rIFN- α 2 de tipo silvestre preparado por Bolder Biotechnology, Inc.				
⁶ La mutación crea una cisteína libre (C98) en la hélice C				
⁷ La mutación crea una cisteína libre (C1) en la región N-terminal				

EJEMPLO 22

Pegilación, Purificación y Bioactividad de PEG-Q5C y PEG-S163C

5

A. pegilación de muteínas de cisteína de IFN- α

Se realizó un experimento de pegilación a pequeña escala con las muteínas de cisteína de rIFN- α 2 purificadas para identificar condiciones que permitieran a las proteínas monopegilarse en el resto de cisteína libre. La reducción excesiva de las proteínas se controló por SDS-PAGE no reductor, buscando un desplazamiento a un peso molecular mayor del aparente esperado como resultado de desplegamiento de la proteína o la aparición de múltiples especies pegiladas generadas como resultado de reducción de disulfuro nativo. Se realizaron experimentos de titulación iniciales con la proteína Q5C. Se incubaron alícuotas de un μ g de Q5C purificado con concentraciones crecientes de TCEP [Tris (2-carboxietil) fosfina]-HCl a temperatura ambiente en Tris 100 mM, pH 8,5 en presencia de diversas cantidades de maleimida-PEG de 5 kDa en exceso. Después de 60 minutos, las reacciones se detuvieron y se analizaron inmediatamente por SDS-PAGE no reductor. Las cantidades de TCEP y reactivo de PEG que produjeron cantidades significativas de proteína Q5C monopegilada (peso molecular de aproximadamente 28 kDa por SDS-PAGE no reductor), sin modificar rIFN- α 2 de tipo silvestre, se usaron para experimentos adicionales. Los experimentos de titulación indicaron que un exceso molar de 10 veces de TCEP y exceso de 20 veces de maleimida PEG 5 kDa proporcionó proteína monopegilada aproximadamente 60 % sin proteína di o tri pegilada detectable o modificación de rIFN- α 2 de tipo silvestre.

Estas condiciones también se usaron para pegilar varias otras muteínas de rIFN- α 2. Se incubaron alícuotas de un μ g de tipo silvestre purificado y las muteínas de rIFN- α 2 (Q5C, T106C, E107C, S163C) durante 1 hora con exceso molar de 10 veces de TCEP y exceso molar de 20 veces de maleimida PEG de 5 kDa a pH 8,5 a temperatura ambiente. Las cuatro muteínas se monopegilaron a diversos grados (que se estima que son de 30 a 60 %) basándose en análisis de SDS-PAGE de las mezclas de reacción. rIFN- α 2 de tipo silvestre no mostró pegilación detectable en estas condiciones. Los experimentos de control indicaron que las muteínas de cisteína Q5C, T106C, E107C y S163C necesitaban reducirse con TCEP para pegilarse. Estos datos indican que la molécula de PEG se une al resto de cisteína introducido en las proteínas Q5C, T106C, E107C y S163C.

B. Preparación y Purificación de IFN- α 2 Q5C-PEG y PEG-S163C:

Se pegilaron mayores cantidades de las muteínas Q5C y S163 de modo que pudieron medirse las actividades biológicas de las proteínas pegiladas. Para la proteína Q5C, las condiciones de pegilación usadas para experimentos a pequeña escala se cambiaron de escala a 140 μ g de proteína para proporcionar suficiente material para purificación y caracterización. La reacción de pegilación mayor se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, se diluyó 10X con MES 20 mM, pH 5,0, se ajustó a pH 3,0 y después se cargó rápidamente en una columna de S-Sepharose usando condiciones similares a las descritas para purificación inicial de las muteínas de rIFN- α 2. La presencia del resto de PEG redujo la afinidad de la proteína por la resina, permitiendo que la proteína pegilada se separara de la proteína no pegilada. El cromatograma de la columna de S-Sepharose mostró dos picos de proteína principales que eluían a aproximadamente NaCl 190 mM y NaCl 230 mM. Se determinó que el pico principal de elución temprana (que eluía a aproximadamente NaCl 190 mM) era Q5C monopegilado por SDS-PAGE. El peso molecular aparente de Q5C monopegilado es de aproximadamente 28 kDa por SDS-PAGE. Se determinó que el pico principal de elución posterior (que eluía a aproximadamente NaCl 230 mM) era proteína Q5C que no había reaccionado. Se agruparon fracciones del pico de elución temprana que contenía predominantemente PEG-Q5C y se usaron para mediciones de bioactividad.

El mutante de cisteína S163C se PEGiló a una escala de 90 µg y se purificó usando protocolos esencialmente idénticos a los descritos para PEG-Q5C.

C. Bioactividades de Muteínas de Cisteína de PEG-Q5C y PEG-S163C:

Se midió la actividad biológica de la proteína PEG-Q5C purificada en el ensayo celular de Daudi descrito en el Ejemplo 20. La concentración de la proteína se determinó usando un ensayo de unión de colorante Bradford. La proteína PEG-Q5C mostró una curva de respuesta a dosis similar y alcanzó el mismo nivel de inhibición de crecimiento máxima que rIFN-α2 de tipo silvestre y la proteína Q5C no modificada, dentro del error del ensayo. La CI₅₀ media para la muteína PEG-Q5C fue de aproximadamente 22 pg/ml, que está dentro de 2 veces los valores de CI₅₀ determinados para IFN-α2 de tipo silvestre y las proteínas Q5C no modificadas analizadas los mismos días (Tabla 5). La bioactividad de la proteína PEG-Q5C es indicativamente mayor que la de rIFN-α2 que se ha pegilado con reactivos de PEG sensibles a amina no específicos. La segunda proteína tiene una CI₅₀ de 164 pg/ml en el ensayo celular de Daudi (Monkarsh *et al.*, 1997). Estos datos se resumen en la Tabla 5.

También se realizaron experimentos de bioactividad con la proteína PEG-S163C. La proteína PEG-S163C también era biológicamente activa e inhibió la proliferación celular de Daudi en el mismo grado que rIFN-α2 de tipo silvestre dentro del error del ensayo. La CI₅₀ media para la proteína PEG-S163C fue de aproximadamente 42 pg/ml, que es mejor que el IFN-α Pegilado con amina.

Tabla 5. Bioactividad de IFN-α PEG-Q5C

Proteína IFN-α	CE ₅₀ media (pg/ml)	Intervalo de CE ₅₀ ¹ (pg/ml)		
		Exp A	Exp B	Exp C
rIFN-α endógeno	13	9	11	20
rIFN-α ²	12	10	10	16
Q5C	12	8.5	11	18
PEG-Q5C	22	18	18	30
IFN-α ³ pegilado con amina	164	-	-	-

¹ Datos de tres experimentos.
² rIFN-α2 preparado por Bolder Biotechnology, Inc.
³ Datos de Monkarsh *et al.* (1997)

Ejemplo 23

La eficacia *in vivo* de las muteínas de cisteína de GH pegilada pueden ensayarse en ratas hipofisectomizadas (HYPOX). Este es un modelo bien caracterizado de deficiencia de GH (Cox *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1996). GH estimula el aumento de peso corporal y el crecimiento de hueso y cartílago en ratas HYPOX (Cox *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1996). Pueden obtenerse ratas Sprague-Dawley hipofisectomizadas de un proveedor comercial tal como Charles River (Wilmington, MA). Típicamente las ratas se hipofisectomizan entre 40 y 50 días de edad y pesan aproximadamente 120 g. Los grupos de 8 ratas deberían recibir inyecciones subcutáneas de rhGH, PEG-Cys-GH o placebo (solución de vehículo) a intervalos específicos y el aumento de peso medirse diariamente durante un periodo de 10 días. Las ratas deberían pesarse diariamente en el mismo momento por día para eliminar posibles variables asociadas con la alimentación. Además del aumento de peso global, puede medirse el crecimiento de hueso (anchura de la epífisis tibial). En el momento del sacrificio, las epífisis tibiales proximales derecha e izquierda pueden retirarse y fijarse en formalina. Las tibias fijadas pueden separarse en el extremo proximal en un plano sagital, teñirse con nitrato de plata y exponerse a una luz fuerte (Greenspan *et al.*, 1949). La anchura de la placa epifisaria cartilaginosa puede medirse usando un estereomicroscopio equipado con una lente ocular micrométrica. Deberían realizarse diez mediciones para cada epífisis y deberían calcularse las medias +/- ETM para los valores combinados para las tibias derecha e izquierda. Pueden hacerse comparaciones entre grupos usando un ensayo de T de Student para comparaciones sencillas y análisis de una vía de la varianza para comparaciones múltiples. P < 0,05 debería considerarse significativo.

La eficacia de las muteínas de cisteína de GH modificadas con PEG de 10 kDa o 20 kDa pueden ensayarse por administración de las proteínas a las ratas diariamente, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días o después de una inyección sencilla. Cinco µg de hGH no pegilada administrada dos veces al día (10 µg BID) por inyección subcutánea proporciona una respuesta de crecimiento fuerte en el modelo de rata HYPOX (Cox *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1996). En experimentos iniciales diferentes grupos de ratas deberían recibir inyecciones subcutáneas de 0,08, 0,4, 2, 10 ó 50 µg de las proteínas Cys-GH pegiladas/inyección/rata. Las ratas de control deberían recibir solamente

solución de vehículo. Los grupos de control adicionales deberían recibir rhGH no pegilada (10 µg BID) y 10 µg de hGH no pegilada usando el mismo régimen de dosificación que las proteínas Cys-GH pegiladas. La administración de las muteínas de cisteína de GH pegiladas a las ratas HYPOX debería dar como resultado un mayor aumento de peso corporal y crecimiento de la anchura de la epífisis tibial en comparación con el grupo tratado con vehículo.

5 La eficacia de las muteínas de cisteína de GH pegiladas también puede ensayarse en modelos de roedor de caquexia. Puede administrarse dexametasona (DEX) a las ratas para inducir pérdida de peso. Los grupos de ratas Sprague-Dawley normales (200 – 225 g) deberían recibir inyecciones subcutáneas diarias de dexametasona (200 µg/rata; aproximadamente 1 mg/kg). Esta cantidad de dexametasona debería inducir una pérdida de
10 aproximadamente 5-6 g durante un periodo de 8 días. Puede administrarse vehículo o dosis diversas de las muteínas de cisteína de GH pegilada a las ratas una vez, diariamente, cada dos días, cada tres días o cada cuatro días en diferentes experimentos. Diferentes grupos de ratas deberían recibir inyecciones subcutáneas de 0,08, 0,4, 2, 10 ó 50 µg de las proteínas Cys-GH pegiladas/inyección/rata. Los controles adicionales deberían incluir un grupo de ratas que no recibirán DEX o inyecciones, un grupo de ratas que recibe DEX y rhGH no pegilada (10 µg BID) y un
15 grupo de ratas que recibe DEX y rhGH no pegilada (10 µg diariamente, cada dos días, cada tres días o cada cuatro días, dependiendo del experimento, es decir la frecuencia con la que se administra la muteína de cisteína de GH pegilada). Los animales deberían pesarse diariamente. El consumo de alimento y agua debería controlarse diariamente. En el momento del sacrificio, deberían pesarse los órganos internos. Debería realizarse análisis estadístico como se ha descrito para los estudios de ratas HYPOX. Los animales tratados con las muteínas de
20 cisteína de GH pegilada deberían perder menos peso que los animales tratados con vehículo.

La eficacia *in vivo* de las muteínas de cisteína de EPO pegiladas pueden medirse en ratas normales demostrando que las proteínas estimulan aumentos del hematocrito y eritropoyesis en comparación con animales tratados con
25 vehículo. EPO estimula un aumento significativo del hematocrito en ratas cuando se dosifican diariamente (Matsumoto *et al.*, 1990; Vaziri *et al.*, 1994; Baldwin *et al.*, 1998). Pueden obtenerse ratas Sprague-Dawley de un proveedor comercial tal como Charles River (Wilmington, MA). Los grupos de 5 ratas deberían recibir inyecciones subcutáneas de rEPO de BV, muteína de cisteína de EPO pegilada o placebo (solución de vehículo) a intervalos específicos durante hasta cinco días. El día 6 los animales deberían sacrificarse y las muestras de sangre recogerse para análisis de hematocrito y conteo de células sanguíneas completo (CBC), que puede realizarse por un
30 laboratorio comercial. Deberían recogerse tejidos hematopoyéticos (hígado y bazo), pesarse y fijarse en formalina para análisis histopatológicos para buscar pruebas de eritropoyesis aumentada. La médula ósea debería retirarse de diversos huesos largos y el esternón para preparaciones de partícula unitaria y análisis histopatológico para buscar pruebas de eritropoyesis aumentada. Deberían realizarse comparaciones entre grupos usando un ensayo de T de Student para comparaciones sencillas y análisis de una vía de la varianza para comparaciones múltiples. P < 0,05 debería considerarse significativo. Las muteínas de cisteína de EPO pegilada deberían estimular aumento del hematocrito y eritropoyesis en las ratas en comparación con los animales inyectados con vehículo. La eficacia de las
35 muteínas de cisteína de EPO pegilada modificadas con PEG de 10 kDa o 20 kDa pueden ensayarse cuando se administran una vez, cada dos días o cada tres días. 100 UI/kg (aproximadamente 800 ng/kg) de EPO no pegilada administrada una vez al día (160 ng SID/200 g de rata) por inyección subcutánea proporciona un aumento significativo del hematocrito (Matsumoto *et al.*, 1990; Vaziri *et al.*, 1994; Baldwin *et al.*, 1998). En experimentos
40 índices diferentes grupos de ratas deberían recibir inyecciones subcutáneas de 0,32, 1,6, 8, 40 ó 160 ng de las muteínas de cisteína de EPO pegiladas. Las ratas de control deberían recibir solamente solución de vehículo. Los grupos de control adicionales deberían recibir rEPO no pegilada (160 ng/SID) y 160 ng de rEPO no pegilada usando el mismo régimen de dosificación que las muteínas de cisteína de EPO pegilada.

45 La eficacia de las muteínas de EPO pegiladas también pueden ensayarse en modelos de anemia inducida por quimioterapia. La anemia inducida por cisplatino es un modelo de roedor bien caracterizado de anemia inducida por quimioterapia y tiene relevancia directa para el ambiente clínico humano. rEPO invierte la anemia en este modelo cuando se administra a dosis diarias de 100 Unidades/kg (Matsumoto *et al.*, 1990; Vaziri *et al.*, 1994; Baldwin *et al.*
50 1998). Deberían tratarse ratas Sprague-Dawley (aproximadamente 200g) el día 0 con una inyección intraperitoneal de cisplatino (3,5 mg/kg) para inducir anemia y seleccionarse de forma aleatoria para diversos grupos de tratamiento. La eficacia de las muteínas de cisteína de EPO pegilada modificadas con PEG 10 kDa o 20 kDa pueden ensayarse cuando se administran una vez (el día 1), cada dos días o cada tres días. Diferentes grupos de ratas deberían recibir inyecciones subcutáneas de 0,32, 1,6, 8, 40 ó 160 ng/inyección de las muteínas de cisteína de EPO
55 pegilada. Debería inyectarse a las ratas compuestos de ensayo durante hasta 8 días. Un grupo de control de ratas debería recibir inyecciones subcutáneas diarias de rEPO (100 Unidades/kg). Otro grupo de control no debería recibir la inyección de cisplatino inicial pero debería recibir inyecciones de solución salina usando los mismos programas de dosificación usados para las muteínas de cisteína de EPO pegilada. El día 9 las ratas deberían sacrificarse y obtenerse muestras sanguíneas y tisulares para análisis de CBC e histopatológicos exhaustivos. Las muteínas de
60 cisteína de EPO pegilada deberían estimular aumentos del hematocrito y eritropoyesis en las ratas en comparación con el grupo de control inyectado con vehículo.

La actividad biológica de IFN-α es relativamente específica de especie, lo que limita la serie de modelos animales preclínicos que pueden estudiarse. Un modelo que puede usarse para medir la eficacia *in vivo* de muteínas de
65 cisteína de IFN-α2 pegilada es la inhibición del crecimiento de xenotransplante de tumor humano en ratones

desnudos atímicos. IFN- α 2 humano no está activo en células de ratón y la inhibición del crecimiento de xenotrasplantes tumorales humanos en ratones desnudos se produce a través de un efecto antiproliferativo directo en las células tumorales humanas. IFN- α 2 inhiben el crecimiento de una diversidad de xenotrasplantes tumorales humanos primarios y líneas celulares tumorales humanas en ratones atímicos (Balkwill *et al.*, 1985; Balkwill, 1986; Johns *et al.*, 1992; Lindner y Borden, 1997). El criterio de valoración primario para los estudios debería ser el volumen tumoral en los ratones tratados. Los inventores esperan descubrir que la administración de las muteínas de cisteína de IFN- α 2 pegilado inhibe el crecimiento tumoral (según se mide por volumen tumoral) en los ratones en relación con animales tratados con vehículo. Los ratones desnudos atímicos pueden obtenerse de un proveedor comercial tal como Charles River. A cada ratón debería inyectarse 2×10^6 células tumorales NIH-OVCAR-3 o MCF-7 (las líneas celulares están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo) el día 0 y asignarse aleatoriamente a grupos de ensayo, consistentes en diez ratones cada uno. Las células tumorales deberían inyectarse en la dermis superpuesta a la glándula mamaria más cercana a la axila. Los diferentes grupos de ensayo deberían recibir inyecciones subcutáneas de diversas dosis de rIFN- α 2 de tipo silvestre, muteína de cisteína de IFN- α 2 pegilado con 10 kDa, muteína de cisteína de IFN- α 2 pegilado con 20 kDa o placebo (solución de vehículo) a intervalos específicos: cada día (SID), cada dos días (EOD) o cada tres días. (ETD). Los volúmenes tumorales deberían determinarse a intervalos de 4 días midiendo la longitud y anchura de los tumores con calibradores, como se ha descrito en Linder y Borden (1997). En el momento del sacrificio, los tumores deberían escindirse y pesarse. Deberían calcularse los volúmenes tumorales medios \pm ETM para cada grupo de ensayo para cada punto de toma de muestras. Deberían realizarse comparaciones entre grupos usando un ensayo de T de Student para comparaciones sencillas y análisis de una vía de varianza para comparaciones múltiples. Cinco μ g de IFN- α 2 no pegilado administrados una vez por día por inyección subcutánea inhibe el crecimiento de células NIH-OVCAR-3 y células MCF-7 en ratones atímicos en 80 % después de 6 semanas (Lindner y Borden, 1997). Puede usarse cualquiera de las líneas celulares para estos estudios. La línea NIH-OVCAR-3 (disponible de la ATCC) no requiere estrógenos para el crecimiento, como las células MCF-7. Los experimentos de xenotrasplantes con células MCF-7 requieren que los ratones se ooforectomizen y se les implanten sedimentos de estrógenos (Lindner y Borden, 1997). En experimentos iniciales, los diferentes grupos de ratones deberían recibir inyecciones subcutáneas de 1 ó 5 μ g por inyección de rIFN- α 2, muteína de cisteína de IFN- α 2 pegilado con 10 kDa o muteína de cisteína de IFN- α 2 pegilado con 20 kDa usando programas de dosificación cada día, cada dos días o cada tres días. La dosificación debería comenzar el día 2 después de la inyección de las células tumorales en los ratones. Los ratones de control deberían recibir solamente solución de vehículo. En los experimentos de dosificación cada dos días y cada tres días, un grupo de control positivo adicional debería recibir inyecciones subcutáneas diarias de 5 μ g de rIFN- α 2 no modificado.

Referencias

- 35 Abdel-Meguid, S. S., Shieh, H-S., Smith W. W. Dayringer, H. E., Violand, B. N. y Bentle, L. A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6434-6437.
- Abrahmsen, L., Moks, T., Nilsson. B. y Uhlen, M. (1986) Nucleic Acids Res. 14: 7487-7500.
- Abuchowski, A., Kazo, G. M., Verhoest, C. R. van Es, T., Kafkewitz, D., Nucci, M. L., Viau, AT. y Davis, F. F. (1984) Cancer Biochem. Biophys. 7: 175-186.
- 40 Alt, F. W., Kellems, RE., Bertino, J. R. y Schimke, R. T. (1978) J. Biol. Chem. 253: 1357-1370.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Iopez-Ferber, M., y Possee, R. D. (1994) Virology 202: 586-605.
- Barik, S. (1993) en "Methods in Molecular Biology", White, B. A., ed. (Humana Press, Totawa, NJ), 15: 277-286.
- Bazan, F. (1991) Immunology Today 11: 350-354.
- Bazan, J. F. (1992) Science 257: 410-411.
- 45 Becker, G. W. y Hsiung, H. M. (1986) FEBS Lett. 204: 145-150.
- Bewley *et al.*, (1969) Biochem. 8: 4701-4708.
- Bill, RM., Winter, P. C., McHale, CM., Hodges, V. M., Elder, G.E., Caley, J., Flitsch, S.L., Bicknell, Rand Lappin, T. R. J. (1995) Biochem. Biophys. Acta 126: 35-43.
- Blatt, L. M., Davis, J. M., Klein, S. B. y Taylor, M. W. (1996) J. Interferon and Cytokine Research 16: 489-499.
- 50 Boissel, J.-P., Lee, W.-R, Presnell, S. R, Cohen, F. E. y Bunn, H. F. (1993) J. Biol. Chem. 268: 15983-15993.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. y Edelstein, S. J. (1996) Protein Methods, 415 páginas, Wiley-Liss. NY, NY.
- Braxton, S. M. (1998) Patente de Estados Unidos 5.766.897.
- Chamow & Ashkenazi (1996), Trends in biotech 14: 52-60.
- Chang, C. N., Rey, B., Bochner, B., Heyneker, H. y Gray, G. (1987) Gene: 189-196.
- 55 Cheah, K-C, Harrison, S., King, R., Crocker, L., Wells, J. R. E. y Robins, A. (1994) Gene, 138: 9-15.
- Clark, R, Olson, K., Fuh, G., Marian, M., Mortensen, D., Teshima, G. Chang, S., Chu, H., Mukku, V., Canova-Davis, E., Somers, T., Cronin, M., Winkler, M. y Wells, J. A. (1996) J. Biol. Chem. 271: 21969-21977.
- Cox, G. N. y McDermott, M. J. (1994) documento WO 9412219.
- Cox, G. N., McDermott, M. J., Merkel, E., Stroh, C. A., Ko, S. C., Squires, C. H., Gleason, T. M. y Russell, D. (1994)
- 60 Endocrinology 135: 1913-1920.
- Cox, G. N. y Russell, D. (1994) documento WO 9.422.466.
- Crouse, G. F., McEwan, R. N., y Pearson, M. L. (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 257-266.
- Cunningham, B. C. y Wells, J. A. (1989) Science 244: 1081-1085.
- Cunningham, B. C., Jhurani, P., Ng, P. y Wells, J. A. (1989) Science 243: 1330-1336.
- 65 Cunningham, B. C., Ultsch, M., de Vos. A. M., Mulkerrin, M. G., Clauser, K. R. y Wells, J. A. (1991) Science 254:

- 821-825.
 Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y., y Davies, D. R. (1992) *Science* 257: 369-373. Davis, S., Aldrich, T. H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N. Y. y Yancopoulos, G. D. (1993) *Science* 260: 1805-1808.
 Davies, A. H. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 543-547.
- 5 DeChiara, T. M., Erlitz, F. y Tarnowski, S.J. (1986) *Methods Enzymology*, 119: 403-15.
 de la Llosa, P., Chene, N. y Martal, J. (1985) *FEBS Letts.* 191: 211-215.
 Deneffe, P., Kovarik, S., Ciora, T. Gosselet, M., Benichou, J.-C., Latta, M. Guinet, F., Ryter, A. y Mayaux, J.-F. (1989) *Gene* 85, 499-510.
 de Vos, A. M., Ultsch, M. y Kossiakoff, A. A. (1992) *Science* 255: 306-312.
- 10 Diederichs, K., Boone, T. y Karplus, A. (1991) *Science* 154: 1779-1782.
 Evinger, M. y Pestka, S. (1981) *Methods Enzymol.* 79: 362-368.
 Fuh, G., Cunningham, B. C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D. V. y Wells, J. A. (1992) *Science* 256: 1677-1680.
 Fujimoto, K., Fukuda, T., y Marumoto, R. (1988) *J. Biotechnol.* 8: 77-86.
 Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B. y Kocher, H. P. (1996) *Prot. Express. Purif.* 8: 271- 282.
- 15 Goeddel, D. V., Heyneker, H. L., Hozumi, T., Arentzen, R, Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R y Seeburg, P.H. (1979) *Nature* 281: 544-548.
 Goodson, R. J. y Katre, N.V. (1990) *Biotechnology* 8: 343-346.
 Greenspan, F. S., Li, C. H., Simpson, M. E. y Evans, H. M. (1949) *Endocrinology* 45: 455-463.
 Ghayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y. e Inouye, M. (1984) *EMBO J.* 3: 2437-2442.
- 20 Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S. *et al.* (1994) *Nature* 368: 643-648
 Hershfield, M. S., Buckley, R. H., Greenberg, M. L. *et al.*, (1987) *N. Engl. J. Medicine* 316: 589-596.
 Hill, C. P., Osslund, T.D. y Eisenberg, D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5167-5171.
 Horisberger, M. A. y Di Marco, S. (1995) *Pharmac. Ther.* 66: 507-534.
 Horoszewicz, J. S., Leong, S. S. y Carter, W. A. (1979) *Science* 206: 1091-1093.
- 25 Horton, R. M. (1993) en "Methods in Molecular Biology", White, B. A., ed. (Humana Press, Totawa, NJ), v.15, 214-250.
 Hsiung, H. M., Mayne, N.G. y Becker, G. W. (1986) *Biotechnology* 4: 991-995.
 Imai, N., Kawamura, A., Higuchi, M., Oheda, M., Orita, T., Kawaguchi, T., y Ochi, N. (1990) *J.Biochem.* 107: 352-359.
 Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. eds. (1998) "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (Academic Press, San Diego, CA).
- 30 Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R, Fritsch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T. y Miyake, T. (1985) *Nature* 313: 806-810.
 Johnson, D. L., Middleton, S. A., McMahon, F. Barbone, F. P., Kroon, D., Tsao, E., Lee, W. H., Mulcahy, L. S. y Jolliffe, L. K. (1996) *Protein Expression Purif.* 7: 104-113.
- 35 Kadonaga, J. Gautier, A. Straus, D. R, Charles, A. D., Edge, M. D. y Knowles, J. R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 2149-2154.
 Khan, F. R y Rai, V. R. (1990) *Bioprocess Technology* 7:161-169.
 Karasiewicz, R, Nalin, C. y Rosen, P. (1995) *Patente de Estados Unidos* 5.382.657.
 Katre, N. V. (1990) *J. Immunology* 144: 209-213.
- 40 Katre, N. V., Knauf, M. J. y Laird, W. J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1487, 1491.
 Kaufman, R. J. (1990) *Meth. Enzymol.* 185: 537-566.
 Kingsley, D. M. (1994) *Genes Dev.* 8: 133-146.
 Kinstler, O. B., Gabriel, N. E., Farrar, C. E. y DePrince, RB. (1996) *Solicitud de Patente Internacional Número* WO 96/11953.
- 45 Knauf, M. J., Bell, D. P., Hirtzer, P., Luo, Z. P., Young, P. D. y Katre, N. V. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 15064-15070.
 Komatsu, N., Nakauchi, H., Miwa, A., Ishihara, T., Eguchi, M., Moroi, M., Okada, M., Sato, Y., Wada, H., Yawata, Y., *et al.*, (1991) *Cancer Research* 51: 341-348.
 Koshland, D. y Botstein, D. (1980) *Cell* 20: 749-760.
- 50 Kutty G., Kutty, RK., Samuel, W., Duncan, T., Jaworski, C., y Wiggert, B. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 644-649.
 Lawton, L. N., Bonaldo, M. F., Jelenc, P. C., Qiu, L., Baumes, S. A., Marcelino, RA., de Jesus, G. M., Wellington, S., Knowles, J. A., Warburton, D., Brown, S., y Soares, M. B. (1997) *Gene* 203: 17-26.
 Li, C. H. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 46: 31-41.
- 55 Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R, Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S.M., Lai, P. H. y Goldwasser, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7580-7584.
 Lu, H. S., Boone, T. C., Souza, L. M., y Lai, P. H. (1989) *Arch. Biochem.Biophys.* 268: 81-92.
 Lucas, B. K., Giere, L. M., DeMarco, M. A., Shen, A., Chisolm, V., y Crowley, C. W. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 1774-1779.
- 60 Lydon, N. B., Favre, C., Bove, S., Neyret, O., Benureau, S., Levine, A. M., Seelig, G. F., Nagabhushan, T. L. y Trotta, P. P. (1985) *Biochemistry* 24: 4131-4141.
 MacGillivray, M. H., Baptista, J. y Johnson, A. (1996) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1806-1809.
 Maisano, F., Testori, S. A., y Grandi, G. (1989) *J. Chromatograph.* 472: 422-427.

- Mark, D. F., Lin, L. S. y Lu, S. D.Y. (1985) Patente de Estados Unidos 4.518.584.
 Mark, D. F., Lu, S. d., Creasey, A. a., Yamamoto, R. y Lin, L. S. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-5666.
 Martal, J., Chene, N. y de la Llosa, P. (1985) FEBS. Letts. 180: 295-299.
 5 Martin, F. H., Suggs, S. V., Langley, K. E., Lu, H. S., Ting, J., Okino, K. H., Morris, F. C., McNiece, I. K., Jacobsen, F.W., Mendiaz, E. A., Birkett, N. C. *et al.*, (1990) Cell 63: 203-211.
 Massague, J. (1990) Annu. Rev. Cell Biol. 6: 597-641.
 Matthews, D. J., Topping, R. S., Cass, RT. y Giebel, L.B. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9471-9476.
 McDonald, N. Q. y Hendrickson, W. A. (1993) Cell 73: 421-424.
 McKay, D. B. (1992) Science 257: 412.
 10 Meyers, F. J., Paradise, C., Scudder, S. A., Goodman, G. y Konrad, M. (1991) Clin. Pharmacol. Ther. 49: 307-313.
 Milburn, M. V., Hassell, A. M., Lambert, M. H., Jordan, S. R., Proudfoot, A. E., Graber, P. y Wells, T. N. C. (1993) Nature 363: 172-176.
 Mills, J. B., Kostyo, J. L., Reagan, C.R., Wagner, S. A., Moseley, M. H. y Wilhelm, A. E. (1980) Endocrinology 107: 391-399.
 15 Mockridge, J. W., Aston, R., Morrell, D. J. y Holder, A. T. (1998) Eur. J. Endocrin. 138: 449-459.
 Monkarsch, S. P., Ma, Y., Aglione, A., Bailon, P. *et al.* (1997) Anal. Biochem. 247: 434- 440.
 Mordenti, J., Chen, S. A., Moore, J. A., Femailo, B. L. y Green, J. D. (1991) Pharmacol. Res. 8:1351-1359.
 Morehead, H., Johnson, P. D. y Wetzel, R. (1984) Biochemistry 23: 2500-2507.
 Morioka-Fujimoto, K., Marumoto, R. y Fukuda, T. (1991) J. Biol. Chem. 266: 1728- 1732.
 20 Mott, H. R y Campbell, I. D. (1995) Current Opinion in Structural Biology 5: 114-121.
 Ostermeier, M., De Sutter., K., Georgiou, G. (1996) J. Biol. Chem. 271: 10616-10622.
 Paonessa, G., Graziani, R., de Serio, A., Savino, R, Ciapponi, L., Lahm, A., Ssalvati, A. L., Toniatti, C. y Ciliberto, G. (1995) EMBO J. 14: 1942-1951. Paul, W. E. ed. (1989) "Fundamental Immunology" (Raven Press, Nueva York, NY).
 Pestka, S., Langer, J. A., Zoon, K. C. y Samuel, C. E. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56: 727-777.
 25 Picken, R. N., Mazaitis, A. J., Maas, W. K., Rey, M. y Heyneker, H. (1983) Infect. and Immun. 42: 269-275.
 Powers, R., Garrett, D. S., March, C. J., Frieden, E. A., Gronenborn, A. M. y Clore, G. M. (1992) Science 256: 1673-1677.
 Ranjan, A. y Hasnain, S. E. (1995) Virus Genes 2:149-153.
 Redfield, C., Smith L. J., Boyd, J., Lawrence, G. M. P., Edwards, R. G., Smith, R.A.G., y Dobson, C. M. (1991)
 30 Biochemistry 30: 11029-11035.
 Roitt, I. M., Brostoff, J., y Male, D. K. eds. (1989) "Immunology" (Gower Medical Publishers, Nueva York, NY y Londres, Reino Unido)
 Rowlinson, S. W. Barnard, R, Bastiras, S., Robins, A. J., Brinkworth, R y Waters, M. J. (1995) J. Biol. Chem. 270: 16833-16839.
 35 Shaw, G., Veldman., G. y Wooters, J. L. (1992) Patentes de Estados Unidos 5.166.322.
 Sytkowski, A. J., Lunn, E. D., Davis, K. L., Feldman, L. y Siekman, S. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1184-1188.
 Tanaka, H., Satake-Ishikawa, R., Ishikawa, M., Matsuki, S. y Asano, K. (1991) Cancer Research 51: 3710-3714.
 Teh, L. C. y Chapman, G. E. (1988) Biochem. Biophys. Res. Comm. 150: 391-398.
 40 Thompson, S. A. (1992) J. Biol. Chem. 267: 2269-2273.
 Trill, J. J., Shatzman, A. R., y Ganguly, S. (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6: 553-560.
 Tuma, R., Rosendahl, M. y Thomas, G. (1995) Biochem. 34: 15150-15156.
 Urlaub, G. y Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220.
 Van Den Berg, C. L., Stroh, C., Hilsenbeck, S. G., Weng, C. N., McDermott, M. J., Cox, G. N. y Yee, D. (1997) Eur. J. Cancer 33: 1108-1113.
 45 Voss, T., Falkner, E., Ahom, H. Krystek, E. Maurer-Fogy, I. Bodo, G., Hauptmann, R. (1994) Biochem. J. 298, 719-725.
 Walter, M. R, Cook. W. J., Ealick, S. E., Nagabhusan, T. L., Trotta, P. T. y Bugg, C. E. (1992) J. Mol. Biol. 224: 1075-1085.
 50 Wang, G. L. y Semenza, G. L. (1993) Blood 82: 3610-3615.
 White, B. A. (1993) in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications edited by Humana Press, Inc., Totowa,NJ.
 Wojchowski, D. M., Orkin, S. H. y Sytkowshi, A. J. (1987) Biochim. Biophys. Acta 910: 224-232.
 Wrighton, N. C., Farrell, F. X., Chang, R. *et al.*, (1996) Science 273: 458-463.
 55 Yamaoka, T., Tabata, Y. y Ikada, Y. (1994) J. Pharm. Sci. 83: 601-606.
 Baldwin, M. D., Zhou, X. J., Ing, T. S. y Vaziri, N. D. (1998) ASAIO J. 44: 44-47.
 Balkwill, F. R., Goldstein, L. y Stebbing, N. (1985) Int. J. Cancer 35: 613-617.
 Balkwill, F. R. (1986) Methods Enzymology 119: 649-657.
 Cecil, R. y McPhee, J. R. (1959). Advances in Protein Chemistry 14, 255-389.
 60 Cox, G. N., McDermott, M. J., Merkel, E., Stroh, C. A., Ko, S. C., Squires, C. H., Gleason, T. M. y Russell, D. (1994) Endocrinology 135: 1913-1920.
 Greenspan, F. S., Li., C. H., Simpson, M. E. y Evans, H. M. (1949) Endocrinology 45: 455-463.
 Johns, T. G., Mackay, I. R., Callister, K. A., Hertzog, P. J., Devenish, R. J. y Linnane, A. W. (1992) J. Natl. Cancer Institute 84: 1185-1190.
 65 Lindner, D. J. y Borden, E. C. (1997) J. Interferon and Cytokine Research 17: 681-693.
 Matsumoto, T., Endoh, K., Kamisango, K., Akamatsu, K., Koizumi, K., Higuchi, M., Imai, N., Misui, H. y Kawaguchi,

- T. (1990) Br. J. Haematol. 75: 463-468.
Torchinskii, Y. M. (1971) in "Sulfhydryl and Disulfide Groups of Proteins" in Studies of Soviet Science (1971) Nauka Press, Moscow.
Trotta, P. B. (1986) Seminars in Oncology XIII Supplement 2: 3-12.
5 Vaziri, N. D., Zhou, X. J., y Liao, S. Y. (1994) Am. J. Physiol. 266: F360-366.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una proteína soluble que tenga al menos una cisteína libre añadida que comprende la etapa de:
- 5 a) obtener una célula hospedadora capaz de expresar la proteína soluble, en la que la proteína soluble contiene al menos una cisteína libre añadida;
- b) exponer la célula hospedadora a un agente de bloqueo de cisteína antes de la etapa (c), en la que dicho agente de bloqueo de cisteína forma un disulfuro estable, reversible, mezclado con al menos un resto de cisteína en dicha proteína soluble; y
- 10 c) aislar la proteína soluble de la célula hospedadora, en la que la proteína soluble contiene al menos una cisteína libre,
- siendo el agente de bloqueo de cisteína un compuesto sensible a tiol seleccionado del grupo que consiste en cistina o un derivado de la misma, cistamina o un derivado de la misma, ácido ditioglicólico o un derivado de la misma y glutatión oxidado o un derivado del mismo.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha etapa (b) de exposición comprende romper la célula hospedadora en presencia del agente de bloqueo de cisteína y en el que dicha etapa (c) de aislamiento comprende aislar la proteína de la fracción soluble de la célula hospedadora rota.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que la exposición de la célula hospedadora a un agente de bloqueo de cisteína se produce antes, durante o después de la síntesis de la proteína soluble por la célula hospedadora y en el que la proteína soluble se secreta de la célula hospedadora.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) de exposición comprende exponer medios que contienen la proteína soluble a un agente de bloqueo de cisteína antes de la etapa (c).
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha célula hospedadora es una célula bacteriana, de levadura, de insecto o de mamífero.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha célula hospedadora es una célula bacteriana.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha célula hospedadora es *E. coli*.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende adicionalmente unir un resto sensible a cisteína a dicha proteína aislada para formar una proteína modificada por cisteína.
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente unir un polietilenglicol a dicha proteína aislada para formar una proteína pegilada.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha proteína soluble es una proteína recombinante.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que una de dos cisteínas implicadas en un enlace disulfuro nativo en dicha proteína soluble se ha suprimido o sustituido con otro aminoácido, dejando la segunda de dichas dos cisteínas como dicha cisteína libre añadida.
- 50 12. El método de la reivindicación 10, en el que dicha proteína recombinante es una muteína de cisteína de un miembro de la familia del supergen de la hormona del crecimiento, un derivado o un antagonista de la misma.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho miembro es hormona del crecimiento.
- 55 14. El método de la reivindicación 12, en el que dicho miembro es eritropoyetina.
15. El método de la reivindicación 12, en el que dicho miembro es interferón alfa (IFN- α).
- 60 16. El método de la reivindicación 12, en el que dicho miembro es interferón alfa 2 (IFN- α 2).
17. El método de la reivindicación 10, en el que dicha proteína recombinante es una muteína de cisteína de un miembro de la superfamilia de TGFbeta, factor de crecimiento derivado de plaquetas A, factor de crecimiento derivado de plaquetas B, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado de cerebro, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor de crecimiento endotelial vascular o un derivado o un antagonista del mismo, leptina, insulina, factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1), superóxido dismutasa, catalasa, asparaginasa, uricasa, factor de crecimiento de fibroblastos, arginasa, angiostatina, endostatina, Factor VIII, Factor IX, antagonista del receptor de
- 65

interleucina 1, proteasa nexina y antitrombina III.

- 5 18. El método de la reivindicación 10, en el que dicha proteína recombinante es una muteína de cisteína de una cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina o un derivado de la misma.
19. Una hormona del crecimiento humana (hGH) pegilada o un derivado de la misma que tenga una CE50 de menos de aproximadamente 400 ng/ml y que se obtiene por el método de la reivindicación 9, en la que el resto de PEG está unido a un bucle C-D o una región proximal a la hélice A de dicha hGH.
- 10 20. Una eritropoyetina pegilada (EPO) o un derivado de la misma que tenga una CE50 de menos de aproximadamente 1000 ng/ml y que se obtiene por el método de la reivindicación 9, en la que el resto de PEG está unido a la región que precede a la hélice A, la región distal a la hélice D, un bucle C-D, un bucle B-C o un bucle A-B de EPO.
- 15 21. Un interferón alfa pegilado (IFN- α 2) o un derivado que tiene una CE50 de menos de aproximadamente 1900 pg/ml y que se obtiene por el método de la reivindicación 9, en el que el resto de PEG está unido a una región proximal a la hélice A, la región distal a la hélice E o un bucle C-D de IFN- α 2.
- 20 22. Uso de una variante de cisteína de la hormona del crecimiento o un derivado de la misma obtenido por el método de la reivindicación 13 o de acuerdo con la reivindicación 19 para la preparación de un medicamento para tratar una afección tratable con hormona del crecimiento seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de hormona del crecimiento, corta estatura resultante de la inadecuación de la hormona del crecimiento, Síndrome de Turner e insuficiencia renal en niños y caquexia.
- 25 23. Uso de una variante de cisteína de EPO o un derivado de la misma obtenido por el método de la reivindicación 14 o de acuerdo con la reivindicación 20 para la preparación de un medicamento para estimular un aumento del hematocrito o anemia inducida por quimioterapia.
- 30 24. Uso de una variante de cisteína de interferón alfa o un derivado de la misma obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 o de acuerdo con la reivindicación 21 para la preparación de un medicamento para tratar una afección tratable con interferón alfa seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad viral, una enfermedad de proliferación celular y crecimiento de células tumorales.
- 35 25. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que dicho derivado es una variante de cisteína pegilada de la hormona de crecimiento, EPO o interferón alfa.
26. Un método para modificar de forma covalente una proteína producida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 10 a 18, que comprende las etapas de:
- 40 a) purificar la proteína soluble;
b) reducir la proteína con un agente reductor de disulfuro; y
c) exponer la proteína a un resto sensible a cisteína para obtener una proteína modificada por cisteína.
- 45 27. El método de la reivindicación 26, que comprende adicionalmente aislar la proteína modificada por cisteína de la proteína no modificada.
28. El método de la reivindicación 26, en el que el resto sensible a cisteína es un polietilenglicol.

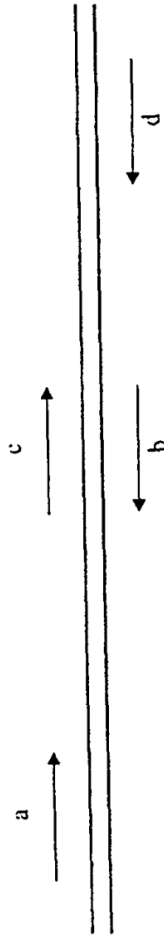


FIG. 1