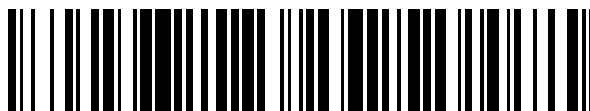


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 424**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02806858 .3**
96 Fecha de presentación: **06.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1456385**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54 Título: **Proteína de fusión de la hormona del crecimiento**

30 Prioridad:
14.12.2001 GB 0130052

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2012

73 Titular/es:
**ASTERION LIMITED
FIRTH COURT, WESTERN BANK
SHEFFIELD S10 2TN, GB**

72 Inventor/es:
**ROSS, Richard;
SAYERS, Jon y
ARTYMIUK, Peter**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 378 424 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

Proteína de fusión de la hormona del crecimiento.

La invención se refiere a polipéptidos quiméricos en los que dichos polipéptidos comprenden un dominio de unión modificado de hormona de crecimiento ligado con un dominio de unión receptor del receptor de hormona de crecimiento.

5 La GH es un miembro de una gran familia de hormonas implicadas en la regulación del crecimiento y desarrollo de mamíferos. La GH humana es un polipéptido de 22 kDa que está implicado en una serie de procesos biológicos. Por ejemplo, crecimiento celular, lactación, activación de macrófagos y regulación del metabolismo energético. La GH interactúa secuencialmente con dos GHR unidos a membrana mediante dos sitios separados en GH designados como sitio 1 y sitio 2. El sitio 1 es un sitio de alta afinidad y el sitio 2 es un sitio de baja afinidad. Una sola molécula de GH se une a un GHR mediante el sitio 1. Se incorpora entonces un segundo GHR mediante el sitio 2, formando un complejo GHR:GH:GHR. Se internaliza entonces el complejo y activa una cascada de transducción de señal que conduce a cambios en la expresión génica.

10 El dominio extracelular de GHR existe en forma de dos dominios ligados cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos (SD-100), estando el dominio SD-100 C-terminal (b) más cercano a la superficie celular y el dominio SD-100 N-terminal (a) más lejano. Es un cambio conformacional en estos dos dominios lo que ocurre en la unión de hormona, con la formación del complejo trimérico GHR-GH-GHR.

15 Se dan a conocer GH modificadas en el documento US 5.849.535, que se incorpora como referencia. La modificación de GH es en ambos sitios de unión, sitio 1 y sitio 2. Las modificaciones del sitio 1 producen una molécula de GH que tiene una mayor afinidad por GHR en comparación con la GH de tipo silvestre. Estas moléculas de GH modificadas actúan como agonistas. Se han dado a conocer también modificaciones del sitio 2 que dan como resultado la creación de antagonistas de GH. Se dan a conocer ejemplos adicionales de modificaciones en GH que alteran la afinidad de unión de GH por el sitio 1 en los documentos US 5.854.026, US 6.004.931, US 6.022.711, US 6.057.292 y US 6.136.563, cada uno de los cuales se incorpora como referencia. Se proporciona en la Tabla 1 un sumario de las modificaciones realizadas al sitio 1. Las modificaciones del sitio 2 se dan a conocer también, en particular el residuo aminoacídico G120 que, cuando se modifica a arginina, lisina, triptófano, tirosina, fenilalanina o ácido glutámico, crea una molécula de GH con propiedades antagonistas.

20 Además, la GH modificada se recubre con polietilenglicol (PEG) mediante un proceso conocido como "pegilación", y esto tiene varios efectos beneficiosos. En primer lugar, el recubrimiento con PEG aumenta el peso molecular eficaz de la GH de 22 kDa a aproximadamente 40 kDa. El efecto que esto tiene es reducir la filtración glomerular de la GH, aumentando así la semivida de la GH *in vivo*, lo que reduce la dosis administrada para producir el efecto deseado. Además, se cree que la pegilación reduce tanto la inmunogenicidad como la toxicidad de las proteínas que se tratan de esta manera, véase Abuchowski *et al.* J. Biol. Chem., 252, 3578-3581, (1977).

25 Sin embargo, es una consecuencia de la pegilación la reducción de la afinidad de la molécula de GH modificada por GHR. Esto significa que se requiere una dosis aumentada para dar cuenta de la afinidad reducida. Esto es indeseable, puesto que contrarresta el efecto ventajoso de la pegilación con respecto a aumentar la semivida de la GH modificada. Sería deseable proporcionar una molécula de GH modificada que no requiriera pegilación pero que tuviera una semivida aumentada y también tuviera los beneficios añadidos de una inmunogenicidad reducida y carencia de toxicidad.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una proteína de fusión como se define en las reivindicaciones.

30 Como se describe anteriormente, son conocidas en la materia mutaciones del sitio 1 que aumentan la afinidad de la hormona de crecimiento por su dominio de unión en receptor de hormona de crecimiento. Dicha hormona de crecimiento modificada actúa como agonista. Si se combina una modificación de sitio 1 con una modificación de sitio 2, en la que la última modificación da como resultado un sitio de unión de sitio 2 inactivo o parcialmente activo, entonces dicha molécula es un antagonista. Una modificación solo en el sitio 2 que explote un sitio de unión de sitio 1 de tipo silvestre crea también un antagonista.

35 Según la invención, dicha modificación del sitio 2 es en el residuo aminoacídico 120 de la secuencia presentada en la Figura 13. Preferiblemente, dicha modificación del sitio 2 se combina con modificaciones del sitio 1 como se dan a conocer en la presente memoria. Como alternativa, la GH se modifica solo en el residuo aminoacídico glicina 120.

Preferiblemente, dicha sustitución es arginina o lisina.

40 En una realización preferida adicional de la invención, el dominio de unión a hormona de crecimiento de GHR es el dominio extracelular de GHR. Más preferiblemente, el dominio de unión es el dominio SD-100 C-terminal de GHR.

45 En una realización preferida de la invención, dicho polipéptido quimérico es una proteína de fusión en la que la GH modificada está en una fusión traduccional en fase con GHR, o parte del mismo. Preferiblemente, dicho polipéptido de fusión comprende GH modificada y el dominio SD-100 C-terminal de GHR.

En una realización alternativa preferida adicional de la invención, el dominio de unión modificado de GH está ligado por un ligador con el dominio de unión a GH de GHR. El ligador puede ser flexible.

5 El ligador podría estar en cualquier residuo dentro del dominio extracelular del receptor, lo que permitiría a la GH modificada unirse flexiblemente con el receptor libre en la superficie celular. Preferiblemente, se realiza el ligamiento entre un residuo cercano al extremo C de la molécula de GH modificada y un residuo cercano al extremo N de GHR. Más preferiblemente, se realiza el ligamiento entre un residuo cercano al extremo C de la molécula de GH modificada y un residuo cercano al extremo N del SD-100 C-terminal. Más preferiblemente, el ligamiento se realiza en cualquiera de los residuos 126-128 del extremo N del SD-100 C-terminal de GHR. En una realización de la invención, el ligamiento se realiza en el residuo 127 del extremo N del SD-100 C-terminal. Preferiblemente, el ligador es un péptido.

10 La estructura cristalina del complejo GHR:GH:GHR revela que la distancia entre el extremo C de GH (residuo 191) y el extremo N del SD-100 C-terminal (residuos 126-128) es de 10 Å. Esto proporciona información inestimable con respecto al diseño de ligador.

15 Preferiblemente, el ligador es un polipéptido que comprende de 5 a 30 residuos aminoacídicos. Más preferiblemente, el ligador comprende de 10 a 20 residuos aminoacídicos. Más preferiblemente aún, el ligador comprende al menos una copia del péptido:

Gly Gly Gly Gly Ser (designado en adelante como "Gly4Ser").

20 En una realización de la invención, el ligador es de 10 aminoácidos de longitud y comprende dos copias del ligador Gly4Ser. En una realización alternativa de la invención, el ligador es de 15 aminoácidos de longitud y comprende tres copias del ligador Gly4Ser. En aún otra realización alternativa, el ligador es de 20 aminoácidos de longitud y comprende cuatro copias del ligador Gly4Ser.

En una realización preferida de la invención, dicho polipéptido deriva de GH humana y GHR humano.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido según la invención.

25 Las moléculas de ácido nucleico que codifican una hormona de crecimiento modificada según la invención pueden sintetizarse típicamente mediante técnicas moleculares conocidas en la materia que incluyen métodos recombinantes, así como la síntesis de moléculas de ácido nucleico usando sintetizadores oligonucleotídicos.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la invención.

30 En una realización preferida de la invención, dicho vector es un vector de expresión adaptado para expresión génica recombinante.

Típicamente, dicha adaptación incluye, por ejemplo y no a modo de limitación, la provisión de secuencias de control de la transcripción (secuencias promotoras) que median la expresión específica de célula/tejido. Estas secuencias promotoras pueden ser específicas de célula/tejido, inducibles o constitutivas.

35 Promotor es un término reconocido en la materia y, por razones de claridad, incluye los siguientes rasgos, que se proporcionan solo como ejemplo y no a modo de limitación. Los elementos potenciadores son secuencias de ácido nucleico de acción en cis encontradas a menudo en dirección 5' del sitio de iniciación de la transcripción de un gen (los potenciadores pueden encontrarse también en dirección 3' de una secuencia génica o incluso localizados en secuencias intrónicas, y por lo tanto son independientes de la posición). Los potenciadores funcionan aumentando la tasa de transcripción del gen con el que está ligado en potenciador. La actividad potenciadora es sensible a los factores de transcripción de acción en trans, que se ha mostrado que se unen específicamente a elementos potenciadores. La unión/actividad de los factores de transcripción (véase "Eukaryotic Transcription Factors" de David S Latchman, Academic Press Ltd, San Diego) es sensible a una serie de señales ambientales que incluyen, como ejemplo y no a modo de limitación, metabolitos intermedios y/o efectores ambientales.

45 Los elementos promotores incluyen también las denominadas secuencia TATA y secuencias de selección de la iniciación de la ARN polimerasa (RIS), que funcionan seleccionando un sitio de iniciación de la transcripción.

Estas secuencias se unen también a polipéptidos que funcionan, entre otras cosas, facilitando la selección de la iniciación de la transcripción por ARN polimerasa.

50 Las adaptaciones incluyen también la provisión de marcadores seleccionables y secuencias de replicación autónoma que facilitan el mantenimiento de dicho vector tanto en células eucarióticas como en el hospedador procariótico. Los vectores que se mantienen autónomamente se designan como vectores episómicos. Los vectores episómicos son deseables, puesto que estas moléculas pueden incorporar grandes fragmentos de ADN (ADN de 30-50 kb). Se describen vectores episómicos de este tipo en el documento WO98/07876, que se incorpora como referencia.

Las adaptaciones que facilitan la expresión de genes codificados por el vector incluyen la provisión de secuencias de terminación de la transcripción/poliadenilación. Esto incluye también la provisión de sitios internos de entrada interna al ribosoma (IRES), que funcionan maximizando la expresión de genes codificados por el vector dispuestos en módulos de expresión bicistrónicos o multicistrónicos.

5 Estas adaptaciones son bien conocidas en la materia. Hay un volumen significativo de bibliografía publicada con respecto a la construcción de vectores de expresión y a las técnicas de ADN recombinante en general. Véanse Sambrook *et al.* (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y. y las referencias en el mismo; Marston, F (1987) "DNA Cloning Techniques: A Practical Approach" Vol III IRL Press, Oxford, RU; "DNA Cloning", FM Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso del polipéptido según la invención como producto farmacéutico. En una realización preferida de la invención, dicho polipéptido es para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo consistente en: gigantismo, acromegalia, cáncer (por ejemplo, tumor de Wilm, sarcoma osteogénico, de mama, colon, próstata o tiroides); retinopatía diabética, nefropatía diabética y otras complicaciones de diabetes y por exceso de GH.

Los polipéptidos y composiciones de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía convencional, incluyendo inyección o mediante infusión gradual con el tiempo. La administración puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, intraocular, subcutánea o transdérmica. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Cuando se administran, las preparaciones farmacéuticas de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Dichas preparaciones pueden contener rutinariamente sales, agentes de tamponación, vehículos compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos.

Las composiciones pueden combinarse, si se desea, con un vehículo farmacéuticamente compatible. El término "vehículo farmacéuticamente compatible" significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para administración a un ser humano. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes de tamponación adecuados incluyendo: ácido acético en forma de sal, ácido cítrico en forma de sal, ácido bórico en forma de sal y ácido fosfórico en forma de sal. Las composiciones farmacéuticas pueden contener también, opcionalmente, conservantes adecuados tales como: cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenos y timerosal.

Según un aspecto adicional más de la invención, se proporciona una célula transformada o transfectada con el ácido nucleico o vector según la invención.

En una realización preferida de la invención, dicha célula es una célula eucariótica. Preferiblemente dicha célula se selecciona del grupo consistente en: un moho mucilaginoso (por ejemplo, *Dictyostelium spp*), una célula de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp*); una célula de mamífero (por ejemplo, ovario de hámster chino); una célula de planta o una célula de insecto (por ejemplo, *Spodoptera spp*).

40 En una realización preferida alternativa, dicha célula es una célula procariótica, preferiblemente *Escherchia coli* o *Bacillus spp*.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de fabricación del polipéptido según la invención que comprende:

- i) proporcionar una célula según la invención;
- 45 ii) incubar dicha célula en condiciones que conduzcan a la producción del polipéptido según la invención, y opcionalmente
- iii) aislar el polipéptido a partir de la célula o medio de cultivo celular.

En un método preferido de la invención, dicho polipéptido está dotado de una señal de secreción para facilitar la purificación del polipéptido a partir de dicha célula. Más preferiblemente aún, dicho polipéptido está dotado de un marcaje de afinidad para facilitar la purificación del polipéptido a partir de dicha célula o del medio de cultivo celular.

Según un aspecto adicional más de la invención, se proporciona un método de tratamiento de un mamífero, preferiblemente un ser humano, que comprende administrar a dicho mamífero el polipéptido según la invención.

Se describe también en la presente memoria un polipéptido quimérico que comprende más de dos dominios de unión de hormona de crecimiento modificada, siendo dicha modificación la adición, delección o sustitución de al menos un residuo aminoacídico.

5 Se describe también en la presente memoria un polipéptido quimérico que comprende una pluralidad de dominios de unión de hormona de crecimiento modificada.

Se describirá ahora una realización de la invención solo como ejemplo y con referencia a la siguiente tabla y figuras:

La Tabla 1 representa un sumario de las sustituciones aminoacídicas del sitio 1 y el sitio 2 de GH humana.

Figura 1. Mapa plasmídico de pHEAT.GH.G1 20R, que se generó ligando el gen GH.G120R, sintetizado por PCR, entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I. El marcador selectivo en el plásmido es Amp^R.

10 Figura 2. Mapa plasmídico de pTrcHis-TOPO. 1A7, que se generó ligando el gen GH.G120R entre los sitios *Bam*HI y *Not*I en pTrcHis 1A1. El ligador es (G₄S)₄ y el marcador selectivo en el plásmido es Amp^R.

Figura 3. Mapa plasmídico de pTrcHis-TOPO. 1B2, que se generó ligando el gen GH.G120R entre los sitios *Bam*HI y *Not*I en pTrcHis 1B1. El ligador es (G₄S)₄ y el marcador selectivo en el plásmido es Amp^R.

15 Figura 4. Mapa plasmídico de pTrcHis-TOPO. 1C3, que se generó ligando el gen GH.G120R entre los sitios *Eco*RI e *Hind*III en pTrcHis 1A7. El ligador es (G₄S)₄ y el marcador selectivo en el plásmido es Amp^R.

Figura 5. Secuencia del gen GH.G120R, que muestra el codón de inicio, el marcaje 6xHis, los sitios de restricción relevantes, los codones de terminación y la mutación G120R (CGC). Se muestra el componente GH.G120R real en MAYÚSCULAS y las regiones secuenciadas en **negrita**.

20 Figura 6. Secuencia del gen 1A7, que muestra el codón de inicio, el marcaje 6xHis, los sitios de restricción relevantes, los codones de terminación y la mutación G120R (CGC). Se muestra el componente GH.G120R-(G₄S)₄-GHR(b) real en MAYÚSCULAS y las regiones secuenciadas en **negrita**.

Figura 7. Secuencia del gen 1B2, que muestra el codón de inicio, el marcaje 6xHis, los sitios de restricción relevantes, los codones de terminación y la mutación G120R (CGC). Se muestra el componente GH.G120R-(G₄S)₄-GHR(flec) real en MAYÚSCULAS y las regiones secuenciadas en **negrita**.

25 Figura 8. Secuencia del gen 1C3, que muestra el codón de inicio, el marcaje 6xHis, los sitios de restricción relevantes, los codones de terminación y la mutación G120R (CGC). Se muestra el componente GH.G120R-(G₄S)₄-GH.G120R real en MAYÚSCULAS y las regiones secuenciadas en **negrita**.

30 Figura 9. Transferencias Western que usan anticuerpo anti-GH humana como anticuerpo primario en geles de PAGE-SDS al 15% para estudios de expresión de GH.G120R, 1A7, 1B2 y 1C3. La expresión era del vector pTrcHis en células XL1 Blue o SURE de *E. coli*; estas muestras se tomaron 4 horas después de la inducción con IPTG 1 mM (concentración final). Las transferencias muestran que GH.G120R y 1C3 producen bandas únicas, mientras que las muestras de 1A7 y 1B2 contienen productos de escisión.

35 Figura 10. Geles de PAGE-SDS al 15% teñidos con Coomassie [C] de GH.G120R, 1A7 y 1C3 purificados. Se muestran también las transferencias Western [W] de estas muestras usando anticuerpo anti-GH humana como anticuerpo primario. Los geles teñidos con Coomassie muestran que las muestras de proteína purificadas son >95% puras, sin embargo, las transferencias Western muestran que solo GH.G120R y 1C3 producen bandas únicas, mientras que la muestra de 1A7 contiene productos de escisión.

40 Figura 11. Gráficos que muestran los resultados del bioensayo de GH para GH.G120R, 1A7 y 1C3. Cada gráfico muestra una curva patrón, el ensayo con el constructo solo a diferentes concentraciones y el ensayo con el constructo a diferentes concentraciones con hgH 25 ng/ml. Estos muestran que ninguna de las proteínas tienen actividad agonista inherente, sino que todas tienen actividad antagonista, siendo GH.G120R la más activa y 1A7 la menos.

La Figura 12 es la secuencia aminoacídica de la GH no modificada.

La Figura 13 es la secuencia de ácido nucleico de la GH no modificada.

Materiales y métodos

45 Se dan a conocer los métodos para generar GH modificada en el sitio 1 y/o el sitio 2 en los documentos US5.849.535, US5.854.026, US6.004.931, US6.022.711, US6.057.292 y US 6.136.563, cada uno de las cuales se incorpora como referencia.

Constructos de ADN**Generación de antagonista de GH mutada en el sitio 2 (GHa)**

5 Se amplificó por PCR el ADNc de GH humana (Fig. 1) a partir de tejido pituitario humano y se clonó en el vector pTrcHis-Topo (pTrcHis-TOPO-GHstop). Se amplificó el dominio extracelular de GHR a partir de ADNc hepático humano usando PCR.

Constructos de antagonista de hormona de crecimiento (G120R)**Mutación G120R de hormona de crecimiento**

10 Se mutó el gen de hormona de crecimiento (GH) usando el método de mutación de ADNmc de fagémido. Se subclonó en primer lugar el gen de GH de pTrcHisGH a pT7T318 entre los sitios *Bam*HI e *Hind*III, produciendo pT7T318-GH. Se transformó entonces este plásmido en CJ236 de *E. coli* y se produjo ADNmc (monocatenario).

Se mutó entonces el pT7T318-GH de ADNmc cambiando el codón de Gly120 de GGC a CGC, usando el cebador GH.(G120R)For (Tabla 1).

Se usó entonces el pT7T318-GH.G120R de ADNbc producido después del proceso de mutación para subclonar GH.G120R en un vector pHEAT, y esto dio pHEAT.GH.G120R (Figura 1).

Generación de constructos de GH.G120R

χ 1A7 [GH.G120R-(G₄S)₄-GHR(b)]=GHa ligado con el dominio b de GHR.

20 Se extrajo el gen GH.G120R de pHEAT.GH.G120R (Fig. 1) usando los sitios de restricción *Bam*HI y *Not*I. Se ligó entonces el gen en lugar del gen de GH en pTrcHis χ 1A1 [GH-(G₄S)₄-GHR(b)] (Fig. 2). Se transformó el plásmido resultante en XL1 Blue de *Escherichia coli* y se sembró en placas de agar con LB (0,3% de glucosa, ampicilina 50 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml).

χ 1B2 [GH.G120R-(G₄S)₄-GHRflec]=GHa ligado con el dominio extracelular completo de GHR

Se repitió la estrategia usada para generar el gen χ 1A7, sin embargo, el vector receptor fue pTrcHis χ 1B1 [GH-(G₄S)₄-GHRflec] (Fig. 3). Se transformó el plásmido resultante en XL1 Blue de *E. coli* y se sembró en placas de agar con LB (0,3% de glucosa, ampicilina 50 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml).

25 χ 1C3 [GH.G120R-(G₄S)₄-GH.G120R]= tándem de GHa

Se efectuó una reacción de PCR en pTrcHisGH usando los cebadores DiGHEcoF1 y DiGHHinR1 (Tabla 1). Se digirió entonces el producto de PCR con *Eco*RI e *Hind*III y se ligó éste entonces en lugar del dominio GHR(b) en pTrcHis χ 1A1 [GH-(G₄S)₄-GHR(b)] (Fig. 4). Se transformó el plásmido resultante en SURE de *E. coli* deficiente recombinante y se sembró en placas de agar con LB (0,3% de glucosa, ampicilina 50 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml, kanamicina 50 μ g/ml).

Resultados de la secuenciación

30 Se secuenciaron los plásmidos que contenían los genes del constructo. Se muestran las secuencias de los genes y regiones secuenciadas para GH.G120R, χ 1A7, χ 1B2 y χ 1C3 en las Fig. 5-8, respectivamente.

Estudios de expresión

35 Se usaron colonias individuales para inocular 3 ml de caldo LB (0,3 de glucosa, ampicilina 50 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml) para células XL1 Blue de *E. coli* y caldo LB (0,3% de glucosa, ampicilina 50 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml, kanamicina 50 μ g/ml) para células SURE de *E. coli*. Se cultivaron éstas agitando durante una noche a 37°C.

Se inocularon entonces 4 ml de medio 4YT, que contiene el antibiótico apropiado, con 200 μ l del cultivo de LB durante una noche. Se cultivaron estos durante 3 horas y se tomaron entonces muestras de 1 ml (muestras T₀).

40 Se indujeron los cultivos de 4YT con IPTG a una concentración final 1 mM y se incubaron entonces adicionalmente durante otras 4 horas (muestras T₄).

Se procesaron las muestras T₀ y T₄ inmediatamente después de que se hubieran tomado. Se centrifugaron en primer lugar para sedimentar las células, se desechó entonces el sobrenadante y se procesó el sedimento mediante procesamiento en un gel PAGE-SDS. Se visualizó la proteína en estos geles de PAGE mediante tinción con Coomassie o transferencia Western usando un anticuerpo anti-GH primario para sondear el constructo.

45 En todos los casos, los geles de PAGE teñidos con Coomassie no mostraron sobreexpresión del constructo. Sin embargo, se observan constructos en las transferencias Western (Fig. 9). Estas muestran que en todos los casos se expresa proteína del tamaño correcto.

Purificación

Se purificó en general la proteína a partir de cultivos de 4x250 ml crecidos en 4YT, que contiene el antibiótico apropiado, y se indujo durante 4-5 horas con IPTG a una concentración final 1 mM. Se recogieron las células mediante centrifugación y se lisaron mediante tratamiento con lisozima y desoxicolato de sodio, seguido de sonicación.

5 Se centrifugaron las células lisadas para retirar el desecho celular y el sobrenadante se purificó inicialmente usando resina ProBond de Invitrogen (columna de Ni). Se eluyó la proteína usando 5 ml de imidazol 0,5 M.

Se purificó adicionalmente la muestra de proteína diluyendo el eluyente de la columna de Ni 10 veces en un tampón adecuado y pasándolo entonces a través de una columna de intercambio iónico MonoQ. Se eluyó la proteína usando un gradiente salino de NaCl 0-1 M durante 20 ml a una velocidad de 0,5 ml/min; se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se analizó entonces en las fracciones la presencia del constructo y se combinaron las fracciones que contenían el constructo.

10

Se analizó la proteína purificada mediante PAGE-SDS (tinción con Coomassie y transferencia Western) (Fig. 10) y se ensayó para medir su concentración. Se sometió entonces la proteína al bioensayo.

15

En los casos de χ 1A7 y χ 1B2, que mostraron productos escindidos por transferencia Western, se sometieron los constructos a un sistema de traducción rápida (RTS) para la transcripción *in vitro*. Estudios previos en χ 1A1 y χ 1B1 han mostrado que la escisión se reducía en gran medida usando el sistema RTS junto con inhibidores de proteasa y caperuzas de expresión.

Bioensayo

20

Se sometieron los constructos purificados al bioensayo de GH estándar Asterion. Se estimularon con el constructo 293 Hi preparadas, que expresan establemente receptor de hormona de crecimiento, usando una serie de dosis. Se preparó también una segunda placa duplicada, pero en la que se añadió GH 25 ng/ml 30 min después de añadir el constructo para observar la capacidad antagonista del constructo.

Todos los constructos de GH.G120R tenían actividades antagonistas (Fig. 11).

Cribado de actividad antagonista

25

Se usa un bioensayo establecido para cribar la actividad antagonista (9). Se transfecta transitoriamente una estirpe celular permanente que expresa el GHR completo con un informador de luciferasa que se une a Stat5 activada (9). 24 horas después, se estimulan las células con GH durante 6 horas con o sin antagonista. Se lisan entonces las células y se mide la actividad luciferasa (9).

Ensayo de la velocidad de aclaramiento metabólico *in vivo*

30

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley y se les implantó una cánula en las venas femoral y yugular. Dos días después, se administra GH quimérica o en tándem mediante inyección intravenosa o subcutánea. Se recogen muestras de sangre por la cánula femoral y se miden los niveles de proteína quimérica, en tándem u oligomérica mediante radioinmunoensayo. Se estiman los parámetros farmacocinéticos usando programas informáticos disponibles que ajustan la concentración de hormona frente al tiempo.

35

La Tabla 1 representa un sumario de las sustituciones aminoacídicas realizadas en el sitio 1 de GH. Las modificaciones en el sitio 2 incluyen la sustitución de G120 por cualquiera de arginina, alanina, lisina, triptófano, tirosina, fenilalanina o ácido glutámico.

H18	H2 1	Q22	F25	D26	Q29	E65	R167	K168	D171	K172	E174	I179
D	N						N	A	S	R	S	T
A		A	A	A	A	A		A			A	
A		A	A	A	A	A					A	
D		A	A	A	A	A		A			S	
A		A	A	A	A	A		A			S	
D		A	A	A	A	A		A			A	
A		A	A	A	A	A		A			A	
D	N						N	A	S	R	S	T
A		A	A	A	A	A		A			A	

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende una fusión traduccional en fase de:
 - i) un dominio de unión modificado de hormona de crecimiento en el que dicha modificación es la sustitución del residuo aminoacídico glicina 120 de la Figura 12 por arginina o lisina; y
 - 5 ii) una parte del receptor de hormona de crecimiento [GHR] que comprende el dominio SD-100 C-terminal de GHR.
2. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que dicha sustitución es de glicina 120 por arginina.
3. Una proteína de fusión según la reivindicación 1 o 2, en la que la parte del receptor de hormona de crecimiento (GHR) es el dominio extracelular de GHR.
- 10 4. Una proteína de fusión según las reivindicaciones 1-3, en la que el dominio de unión modificado de GH está ligado por un ligador con el dominio de unión a GH de GHR.
5. Una proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que el ligador es un polipéptido que comprende de 5 a 30 residuos aminoacídicos.
6. Una proteína de fusión según la reivindicación 5, en la que el ligador comprende de 10 a 20 residuos aminoacídicos.
- 15 7. Una proteína de fusión según la reivindicación 4 o 5, en la que el ligador comprende al menos una copia del péptido Gly Gly Gly Gly Ser.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 20 9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.
10. Un vector según la reivindicación 9, en el que dicho vector es un vector de expresión adaptado para expresión recombinante.
11. Una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso como producto farmacéutico.
12. Una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo consistente en gigantismo, acromegalia, cáncer, tumor de Wilm, sarcoma osteogénico, de mama, colon, próstata, tiroides, retinopatía diabética, nefropatía diabética, complicaciones diabéticas y cualquier enfermedad por exceso de GH.
- 25 13. Una proteína de fusión según la reivindicación 12 para uso en el tratamiento de acromegalia.
14. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 30 15. Una célula transformada o transfectada con el ácido nucleico o vector según cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
16. Una célula según la reivindicación 15, en la que dicha célula es una célula eucariótica seleccionada del grupo consistente en: un moho mucilaginoso, *Dictyostelium spp*, una célula de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp*; una célula de mamífero, ovario de hámster chino; una célula de planta; una célula de insecto, *Spodoptera spp*.
- 35 17. Una célula según la reivindicación 15, en la que dicha célula es una célula procariótica.
18. Un método de fabricación de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende
 - i) proporcionar una célula según cualquiera de las reivindicaciones 15-17,
 - 40 ii) incubar dicha célula en condiciones que conduzcan a la producción de dicha proteína de fusión; y opcionalmente
 - iii) aislar la proteína de fusión a partir de la célula o el medio de cultivo celular.
19. Un método según la reivindicación 18, en el que dicha proteína de fusión está dotada de una señal de secreción para facilitar la purificación de la proteína de fusión a partir de dicha célula.

20. Un método según la reivindicación 19, en el que dicha proteína de fusión está dotada de un marcaje de afinidad para facilitar la purificación de la proteína de fusión a partir de dicha célula o el medio de cultivo celular.

21. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, que comprende una fusión traduccional en fase de:

5 i) una hormona de crecimiento modificada en la que dicha modificación es una sustitución de: histidina 18 con ácido aspártico, de histidina 21 con asparagina, de glicina 120 con arginina, de arginina 167 con asparagina, de lisina 168 con alanina, de ácido aspártico 171 con serina, de lisina 172 con arginina, de ácido glutámico 174 con serina y de isoleucina 179 con treonina; y

ii) una parte del receptor de hormona de crecimiento [GHR] que comprende el dominio SD100 C-terminal de GHR.

10

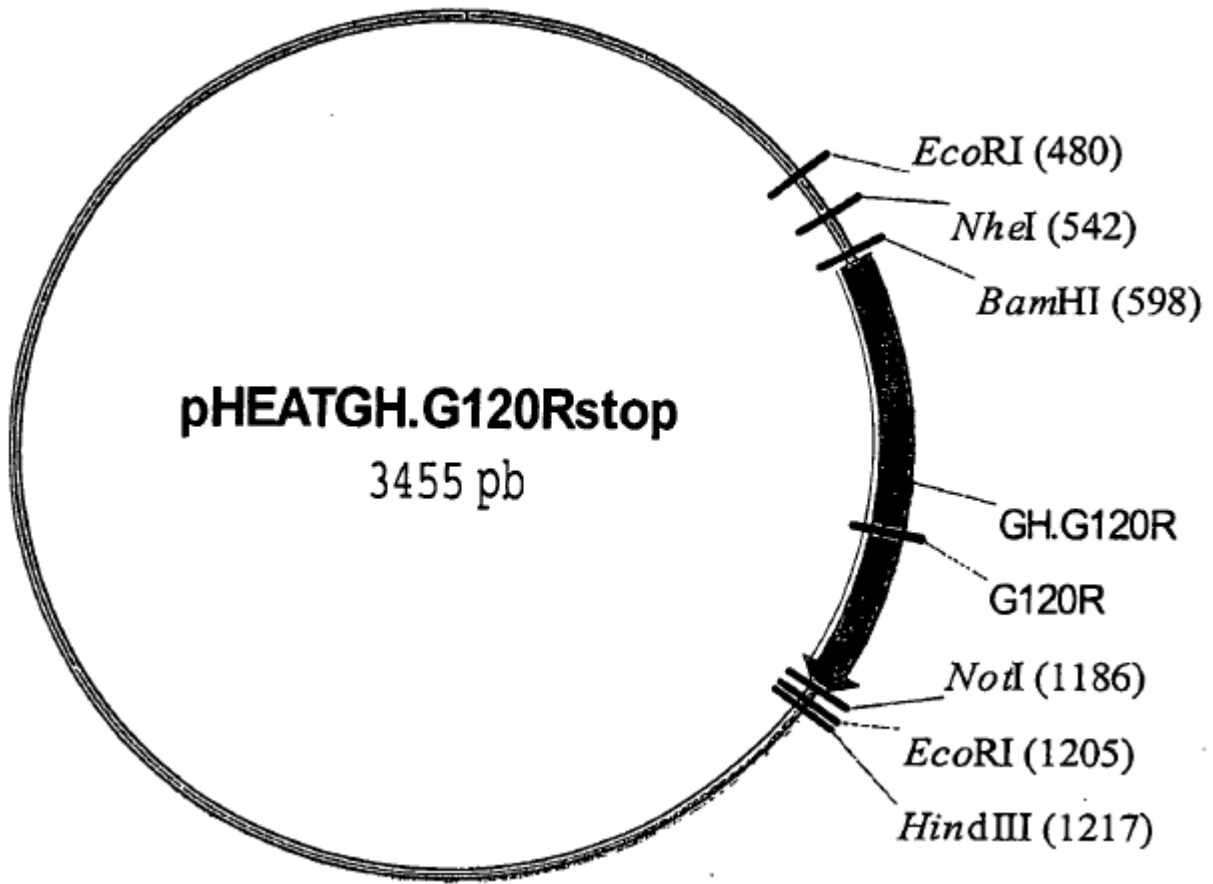


Figura 1

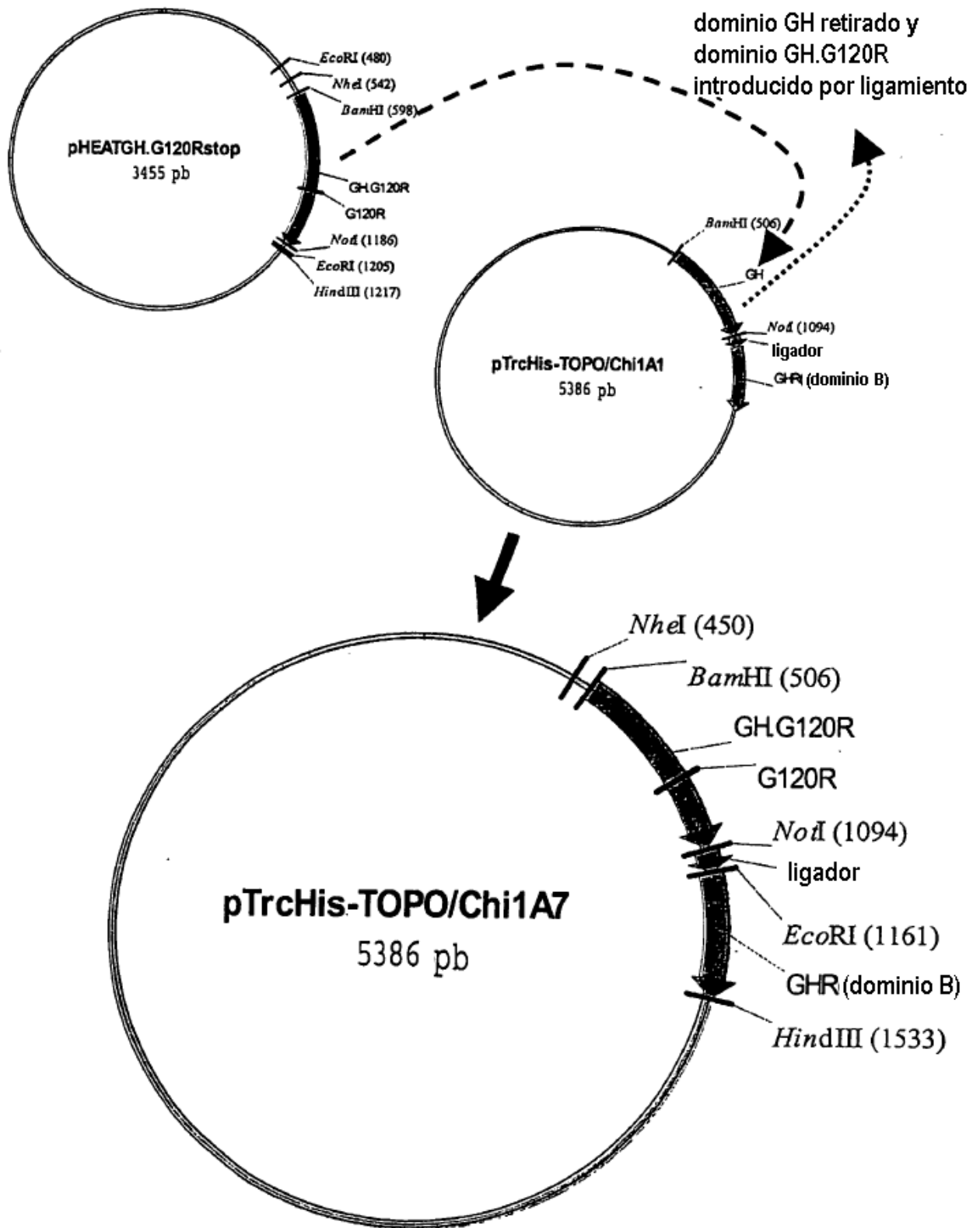


Figura 2

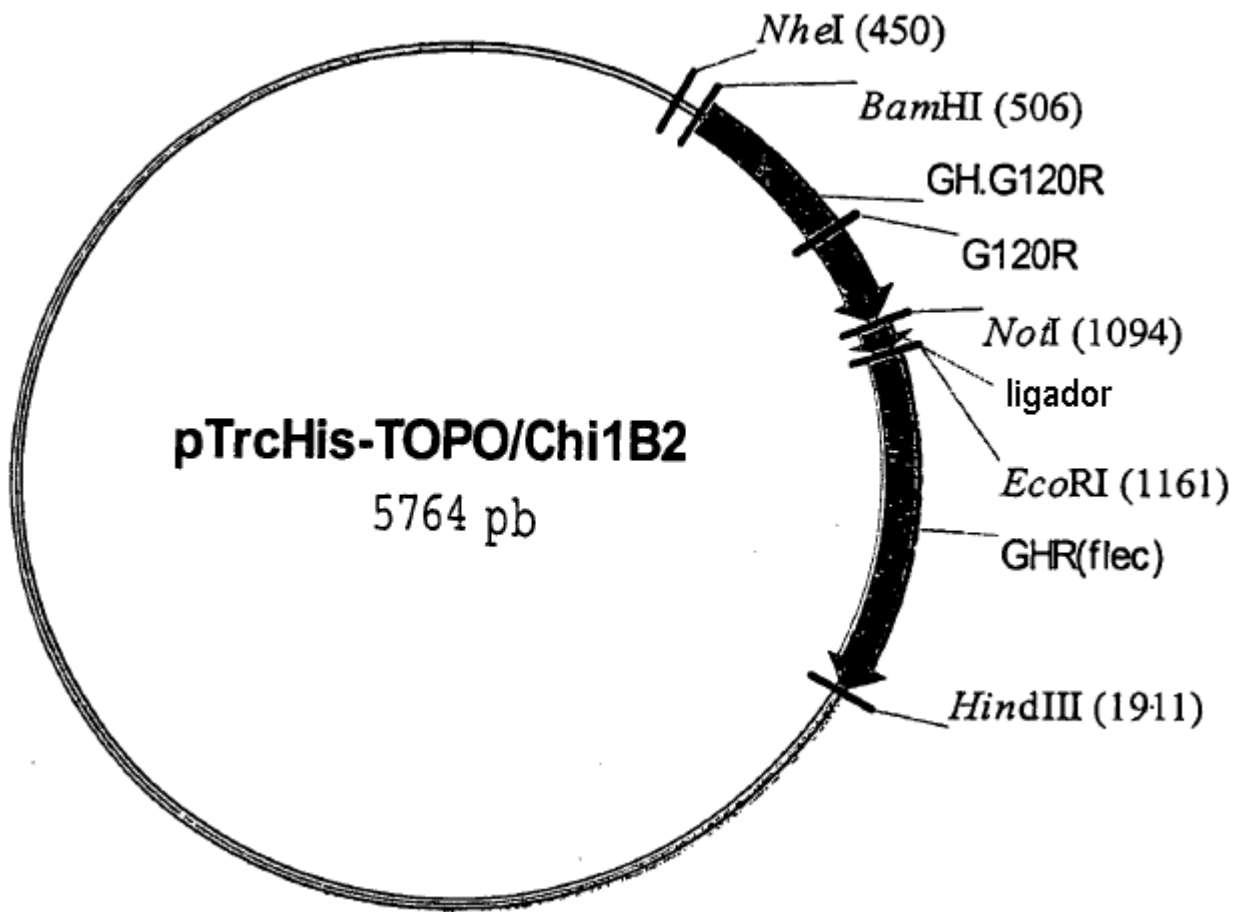


Figura 3

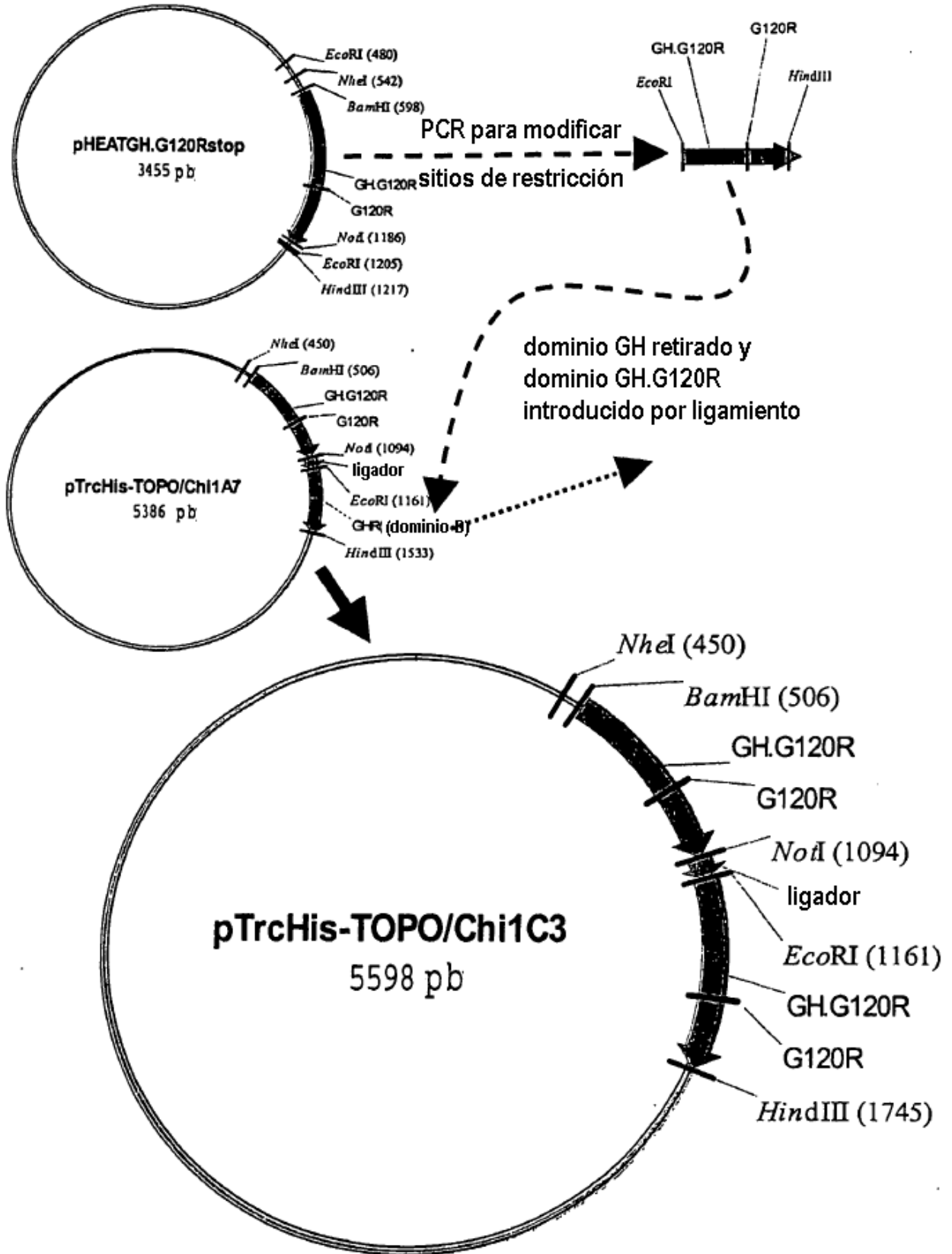


Figura 4

inicio **6 x His**
atggggggtt ct catcatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg
BamHI
tggacagcaa atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatccaa

ccctTTTCCC AACCATTTCCC TTATCCAGGC TTTTGGACAA CGCTAGTCTC
CGCGCCCATC GTCTGCACCA GCTGGCCTTT GACACCTACC AGGAGTTTGA
AGAAGCCTAT ATCCCAAAGG AACAGAAGTA TTCATTCTTG CAGAACCCCC
AGACCTCCCT CTGTTTCTCA GAGTCTATTC CGACACCCTC CAACAGGGAG
GAAACACAAC AGAAATCCAA CCTAGAGCTG CTCCGCATCT CCCTGCTGCT
CATCCAGTCG TGGCTGGAGC CCGTGCAGTT CCTCAGGAGT GTCTTCGCCA
ACAGCCTGGT GTACGGCGCC TCTGACAGCA ACGTCTATGA CCTCCTAAAG
GACCTAGAGG AACGCATCCA AACGCTGATG GGGAGGCTGG AAGATGGCAG
CCCCGGACT GGGCAGATCT TCAAGCAGAC CTACAGCAAG TTCGACACAA
ACTCACACAA CGATGACGCA CTA CTCAAGA ACTACGGGCT GCTCTACTGC
TTCAGGAAGG ACATGGACAA GGTCGAGACA TTCCTGCGCA TCGTGCAGTG

NotI terminaci3n
CCGCTCTGTG GAGGGCAGCT GTGGCTTCg cggccgctga taa terminaci3n

Figura 5

inicio 6 x His
 [atg]ggggggtt ct[catcatca tcatcatcat] ggtatggcta gcatgactgg
BamHI
 tggacagcaa atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat a[aggatcc]aa

 ccctTTTCCC AACCATTCCC TTATCCAGGC TTTTGGACAA CGCTAGTCTC
 CGCGCCCATC GTCTGCACCA GCTGGCCTTT GACACCTACC AGGAGTTTGA
 AGAAGCCTAT ATCCCAAAGG AACAGAAGTA TTCATTCTG CAGAACCCCC
 AGACCTCCCT CTGTTTCTCA GAGTCTATTC CGACACCCTC CAACAGGGAG
 GAAACACAAC AGAAATCCAA CCTAGAGCTG CTCCGCATCT CCCTGCTGCT
 CATCCAGTCG TGGCTGGAGC CCGTGCAGTT CCTCAGGAGT GTCTTCGCCA
 ACAGCCTGGT GTACGGCGCC TCTGACAGCA ACGTCTATGA CCTCCTAAAG
 GACCTAGAGG AA[CGC]ATCCA AACGCTGATG GGGAGGCTGG AAGATGGCAG
 CCCCCGGACT GGGCAGATCT TCAAGCAGAC CTACAGCAAG TTCGACACAA
 ACTCACACAA CGATGACGCA CTACTIONAAGA ACTACGGGCT GCTCTACTGC
 TTCAGGAAGG ACATGGACAA GGTCGAGACA TTCCTGCGCA TCGTGCAGTG
NotI
 CCGCTCTGTG GAGGGCAGCT GTGGCTTCG[CGGCCG]GGT GGCGGAGGTA
EcoRI
 GTGGTGGCGG AGGTAGCGGT GGCGGAGGTT CTGGTGGCGG AGGTTCC[GAA]

 [TTC]GAAATAG TGCAACCAGA TCCACCCATT GCCCTCAACT GGACTTTACT
 GAACGTCAGT TTAACCTGGGA TTCATGCAGA TATCCAAGTG AGATGGGAAG
 CACCACGCAA TGCAGATATT CAGAAAGGAT GGATGGTTCT GGAGTATGAA
 CTTCAATACA AAGAAGTAAA TGAAACTAAA TGGAAAATGA TGGACCCTAT
 ATTGACAACA TCAGTTCCAG TGTACTIONATT GAAAGTGGAT AAGGAATATG
 AAGTGCGTGT GAGATCCAAA CAACGAAACT CTGGAAATTA TGGCGAGTTC
 AGTGAGGTGC TCTATGTAAC ACTTCCTCAG ATGAGCCAAT TTACATGTGA
terminación terminación HindIII
 AGAAGATTTT TAC[tgataaa agctt]

Figura 6

inicio 6 x His
 [atg]gggggtt ct[catcatca tcatcatcat] ggtatggcta gcatgactgg
BamHI
 tggacagcaa atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatccaa

 ccctTTTCCC AACCATTCCC TTATCCAGGC TTTTGGACAA CGCTAGTCTC
 CGCGCCCATC GTCTGCACCA GCTGGCCTTT GACACCTACC AGGAGTTTGA
 AGAAGCCTAT ATCCCAAAGG AACAGAAGTA TTCATTCTTG CAGAACCCCC
 AGACCTCCCT CTGTTTCTCA GAGTCTATTC CGACACCCTC CAACAGGGAG
 GAAACACAAC AGAAATCCAA CCTAGAGCTG CTCCGCATCT CCCTGCTGCT
 CATCCAGTCG TGGCTGGAGC CCGTGCAGTT CCTCAGGAGT GTCTTCGCCA
 ACAGCCTGGT GTACGGCGCC TCTGACAGCA ACGTCTATGA CCTCCTAAAG
 GACCTAGAGG AA[CGC]ATCCA AACGCTGATG GGGAGGCTGG AAGATGGCAG
 CCCCCGACT GGGCAGATCT TCAAGCAGAC CTACAGCAAG TTCGACACAA
 ACTCACACAA CGATGACGCA CTACTCAAGA ACTACGGGCT GCTCTACTGC
 TTCAGGAAGG ACATGGACAA GGTCGAGACA TTCCTGCGCA TCGTGCAGTG
NotI
 CCGCTCTGTG GAGGGCAGCT GTGGCTTCGG [CGGCCGCGGT] GCGGGAGGTA
EcoRI
 GTGGTGGCGG AGGTAGCGGT GCGGGAGGTT CTGGTGGCGG AGGTTCCGAA]

[TTC]TTTTCTG GAAGTGAGGC CACAGCAGCT ATCCTTAGCA GAGCACCCCTG
 GAGTCTGCAA AGTGTTAATC CAGGCCTAAA GACAAATTCT TCTAAGGAGC
 CTAAATTAC CAAGTGCCGT TCACCTGAGC GAGAGACTTT TTCATGCCAC
 TGGACAGATG AGGTTTATCA TGGTACAAAG AACCTAGGAC CCATACAGCT
 GTTCTATACC AGAAGGAACA CTCAAGAATG GACTCAAGAA TGGAAAGAAT
 GCCCTGATTA TGTTTCTGCT GGGGAAAACA GCTGTTACTT TAATTCATCG
 TTTACCTCCA TCTGGATACC TTATTGTATC AAGCTAACTA GCAATGGTGG
 TACAGTGGAT GAAAAGTGTT TCTCTGTTGA TGAAATAGTG CAACCAGATC
 CACCCATTGC CCTCAACTGG ACTTTACTGA ACGTCAGTTT AACTGGGATT
 CATGCAGATA TCCAAGTGAG ATGGGAAGCA CCACGCAATG CAGATATTCA
 GAAAGGATGG ATGGTTCTGG AGTATGAACT TCAATACAAA GAAGTAAATG
 AACTAAATG GAAAATGATG GACCCTATAT TGACAACATC AGTTCCAGTG
 TACTCATTGA AAGTGGATAA GGAATATGAA GTGCGTGTGA GATCCAAACA
 ACGAAACTCT GGAAATTATG GCGAGTTCAG TGAGGTGCTC TATGTAACAC

HindIII terminación terminación
 TTCCTCAGAT GAGCCAATTT ACATGTGAA GAAGATTTCTA Ctgataaaag]

[ctt]

Figura 7

inicio 6 x His
 [atg]ggggggtt ct[catcatca tcatcatcat] ggtatggcta gcatgactgg
BamHI
 tggacagcaa atgggtcggg atctgtacga cgatgacgat a[aggatcc]aa

 ccctTTTCCC AACCATTCCTC TTATCCAGGC TTTTGGACAA CGCTAGTCTC
 CGCGCCCATC GTCTGCACCA GCTGGCCTTT GACACCTACC AGGAGTTTGA
 AGAAGCCTAT ATCCCAAAGG AACAGAAGTA TTCATTCTTG CAGAACCCCC
 AGACCTCCCT CTGTTTCTCA GAGTCTATTC CGACACCCTC CAACAGGGAG
 GAAACACAAC AGAAATCCAA CCTAGAGCTG CTCCGCATCT CCCTGCTGCT
 CATCCAGTCG TGGCTGGAGC CCGTGCAGTT CCTCAGGAGT GTCTTCGCCA
 ACAGCCTGGT GTACGGCGCC TCTGACAGCA ACGTCTATGA CCTCCTAAAG
 GACCTAGAGG A[CGC]ATCCA AACGCTGATG GGGAGGCTGG AAGATGGCAG
 CCCCCGACT GGGCAGATCT TCAAGCAGAC CTACAGCAAG TTCGACACAA
 ACTCACACAA CGATGACGCA CTACTIONAAGA ACTACGGGCT GCTCTACTGC
 TTCAGGAAGG ACATGGACAA GGTCGAGACA TTCCTGCGCA TCGTGCAGTG
NotI
 CCGCTCTGTG GAGGGCAGCT GTGGCTTC[G CGGCCG]GGT GGCGGAGGTA
EcoRI
 GTGGTGGCGG AGGTAGCGGT GGCGGAGGTT CTGGTGGCGG AGGTTCC[GAA]

 [TTC]TTTCCCG AAGTGAGGCC ACAGCAGCTA TCCTTAGCAG AGCACCCCTGA
 ACCATTCCCT TATCCAGGCT TTTTGGACAA GCTAGTCTCC GCGCCCATCG
 TCTGCACCAG CTGGCCTTTG ACACCTACCA GGAGTTTGA GAAGCCTATA
 TCCCAAAGGA ACAGAAGTAT TCATTCTGCA AGAACCCCCA GACCTCCCTC
 TGTTTCTCAG AGTCTATTCC GACACCCTCC AACAGGGAGG AAACACAACA
 GAAATCCAAC CTAGAGCTGC TCCGCATCTC CCTGCTGCTC ATCCAGTCGT
 GGCTGGAGCC CGTGCAGTTC CTCAGGAGTG TCTTCGCCAA CAGCCTGGTG
 TACGGCGCCT CTGACAGCAA CGTCTATGAC CTCCTAAAGG ACCTAGAGGA
 A[CGC]ATCCA ACGCTGATGG GGAGGCTGGA AGATGGCAGC CCCCCGACTG
 GGCAGATCTT CAAGCAGACC TACAGCAAGT TCGACACAAA CTCACACAAC
 GATGACGCAC TACTCAAGAA CTACGGGCTG CTCTACTGCT TCAGGAAGGA
 CATGGACAAG GTCGAGACAT TCCTGCGCAT CGTGCAGTGC CGCTCTGTGG
 terminación terminación HindIII
 AGGGCAGCTG TGGCTT[cta taa]aagctt

Figura 8

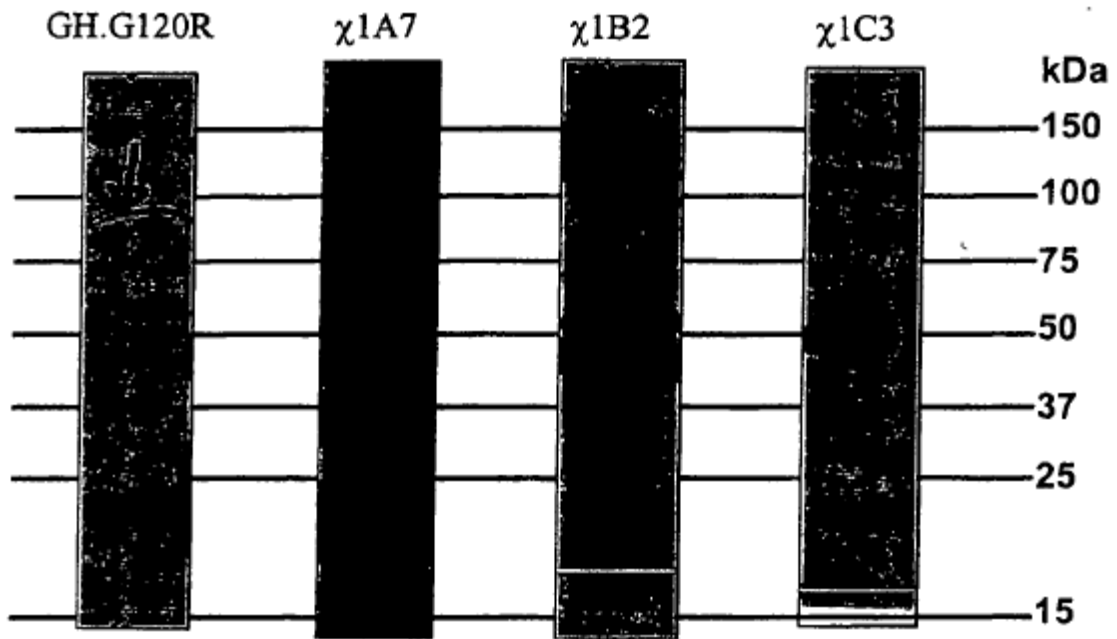


Figura 9

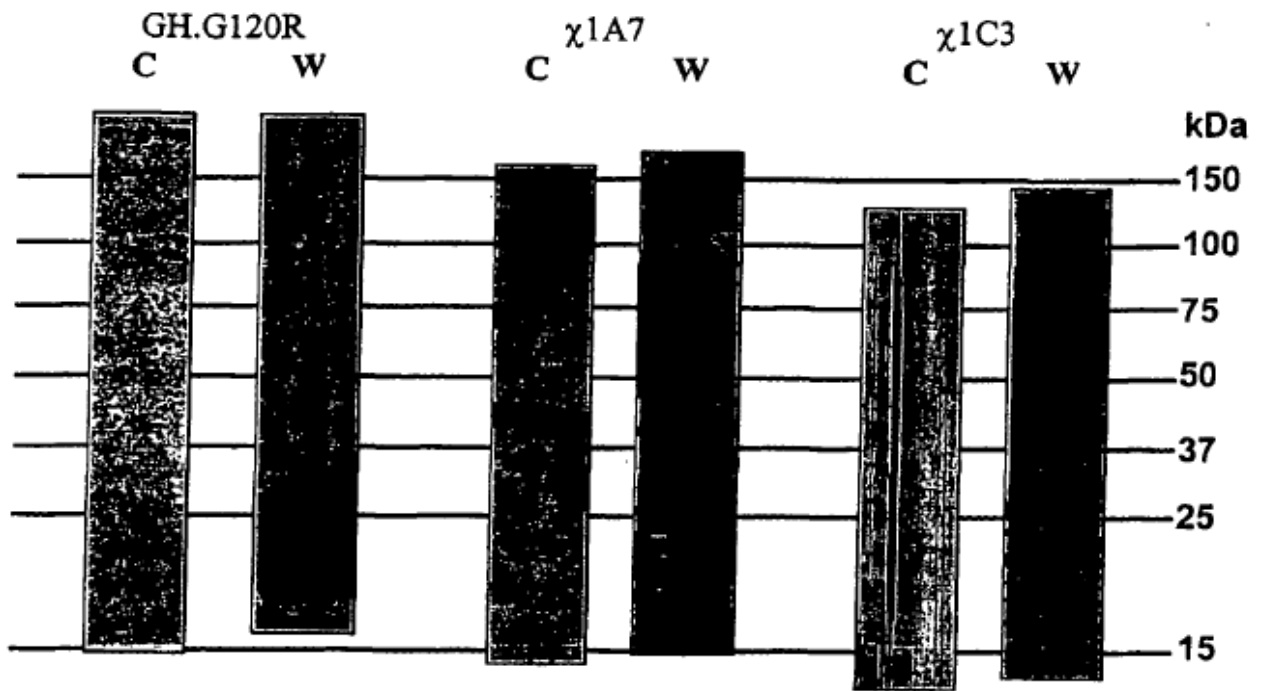


Figura 10

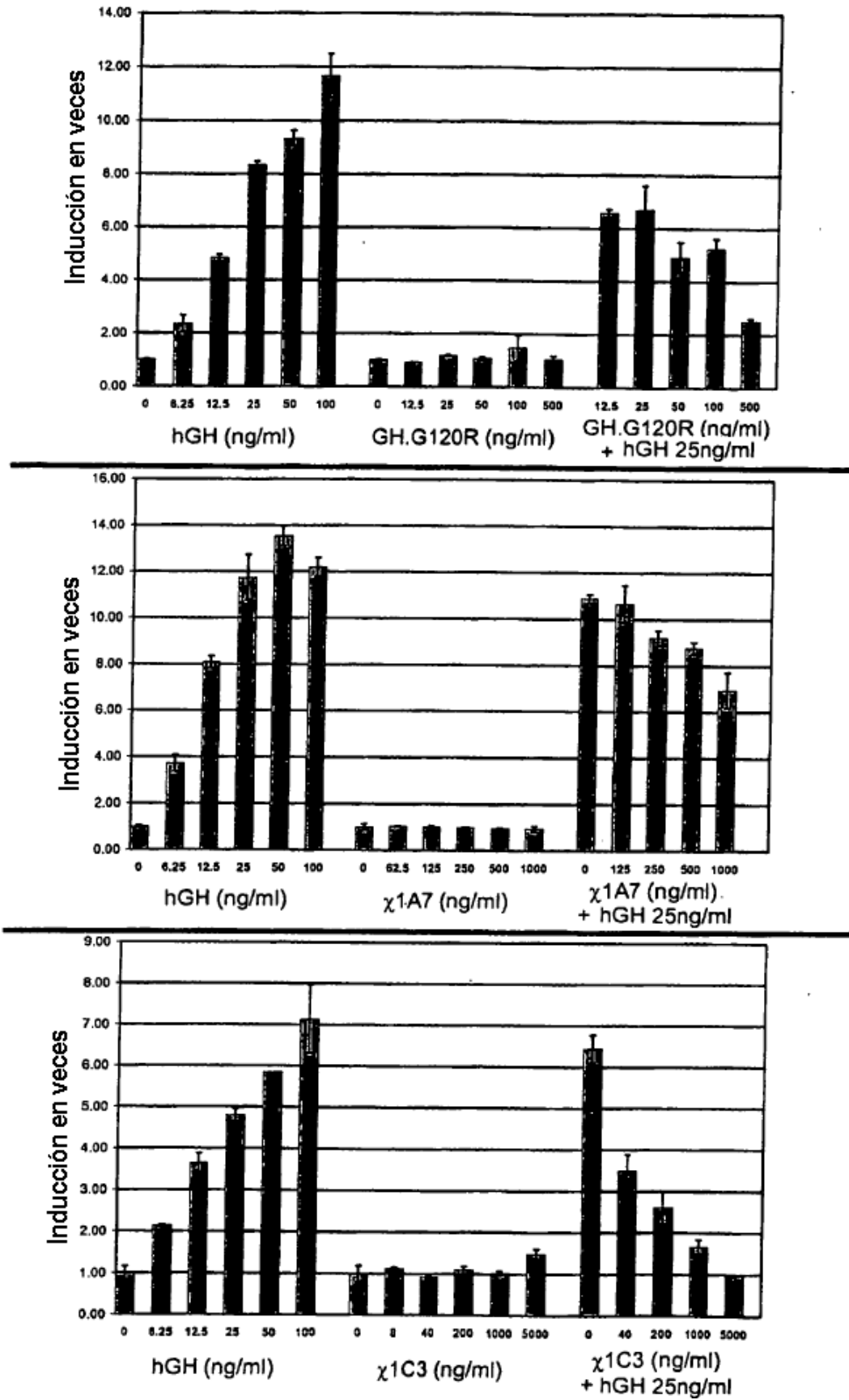


Figura 11

1 Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu
16 Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu
31 Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu
46 Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr
61 Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu
76 Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
91 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala
106 Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly
121 Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr
136 Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
151 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys
166 Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val
181 Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

Figura 12

ES 2 378 424 T3

```

1   TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT AGT CTC
46  CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG
91  TTT GAA GAA GCC TAT ATC CCA AAG GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG
136 CAG AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT TTC TCA GAG TCT ATT CCG ACA
181 CCC TCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG AAA TCC AAC CTA GAG CTG
226 CTC CGC ATC TCC CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTG GAG CCC GTG
271 CAG TTC CTC AGG AGT GTC TTC GCC AAC AGC CTG GTG TAC GGC GCC
316 TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA AAG GAC CTA GAG GAA GGC
361 ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC CGG ACT
406 GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC TCA
451 CAC AAC GAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC
496 TTC AGG AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG
541 CAG TGC CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC

```

Figura 13