

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 022**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04805919 .0**
96 Fecha de presentación: **03.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1704164**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2006**

54 Título: **Proteínas de fusión a interleucina-11**

30 Prioridad:
03.12.2003 EP 03027770

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2012

73 Titular/es:
Kröz, Monika
Morgangasse 11
88499 Altheim, DE;
Weimer, Thomas;
Hauser, Hans-Peter y
Dickneite, Gerhard

72 Inventor/es:
KRÖZ, Monika;
DICKNEITE, Gerhard;
HAUSER, Hans-Peter;
WEIMER, Thomas y
SLEEP, Darrell

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 380 022 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

Proteínas de fusión a interleucina-11

Campo de la invención

5 La invención se refiere a nuevas composiciones para el tratamiento o la profilaxis de la trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand (EVW) o enfermedades inflamatorias, tal como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Antecedentes de la invención**Función fisiológica de la IL-11**

10 La interleucina once (IL-11) es una citocina hematopoyética que promueve la megacariocitopoyesis y la trombocitopoyesis estimulando la proliferación de células madre primitivas, células progenitoras multipotentes y comprometidas (en sinergia con otros factores de crecimiento hematopoyéticos como IL-3, IL-6, FEC-GM), dando como resultando la maduración de megacariocitos y la producción de plaquetas aumentada. Debido a la actividad descrita anteriormente, como efecto secundario, estimula la eritropoyesis, pero muestra poco efecto sobre la proliferación de neutrófilos. También tiene efectos tróficos sobre las células de la mucosa intestinal. Además la IL-11 induce en los hepatocitos la secreción de proteínas de fase aguda (ferritina, haptoglobina, PCR, fibrinógeno).
15 También muestra propiedades antiinflamatorias inhibiendo a macrófagos y la función efectora de linfocitos T. Inhibe la producción del FNT- α , la IL-1 β , IL-12, IL-6 y NO de macrófagos activados *in vitro*. Fisiológicamente, la IL-11 se produce por una diversidad de células estromales, como fibroblastos, células epiteliales, condrocitos y osteoblastos. Generalmente, en individuos normales no se detecta en plasma. La degradación y la eliminación de la IL-11 continúan sin comprenderse bien.

20 Características bioquímicas de la IL-11

La IL-11 es un polipéptido de 19 kDa que consiste en 178 aminoácidos (AA), más una secuencia líder secretora de 21 AA, que no contiene restos de glucosilación potenciales, enlaces disulfuro u otras modificaciones post-traduccionales, y tiene una estrecha similitud con la IL- 6. Se une a un complejo receptor multimérico que contiene una subunidad α receptora específica de IL-11 y una subunidad β promiscua (gp130).

25 La IL-11 humana recombinante (Oprelvekin, Neumega® de Genetics Institute/Wyeth) es una interleucina-11 de 2-178 aminoácidos producida en *E. coli* que carece del resto de prolina amino-terminal. Esto puede ser necesario para lograr la secreción de la célula huésped pero supuestamente no afecta a la actividad de la citocina.

Trombocitopenia inducida por quimioterapia

30 La trombocitopenia es un problema significativo para los pacientes que reciben quimioterapia agresiva o prolongada para tumores malignos. Para algunos agentes quimioterapéuticos, tales como carboplatino, representa la toxicidad limitante de dosis predominante y actúa de forma acumulativa.

35 En la actualidad, la transfusión de plaquetas es el tratamiento convencional para la trombocitopenia. Sin embargo, las transfusiones de plaquetas son costosas y se asocian con un riesgo significativo de aloinmunización y transmisión de enfermedades de transmisión sanguínea. Aproximadamente del 5 al 30% de las transfusiones de plaquetas se asocian con reacciones habitualmente febriles, no hemolíticas. Además, las plaquetas son un recurso limitado con una vida útil de 5 días solamente. De esta manera, los agentes que promueven la producción de plaquetas son una alternativa atractiva a las transfusiones de plaquetas para la prevención o el tratamiento de la trombocitopenia. La IL-11 humana recombinante (Oprelvekin, Neumega®) se aprobó en 1997 en los Estados Unidos para la profilaxis secundaria de la trombocitopenia inducida por quimioterapia. Otras posibles indicaciones incluyen la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis y enfermedad de von Willebrand.

Ventajas esperadas de la fusión de la IL11 a la albúmina

45 El tratamiento seguro y eficaz de la trombocitopenia sigue siendo una necesidad médica no satisfecha. La IL-11 humana recombinante (Oprelvekin, Neumega®) tiene una semivida muy corta de 6,9 horas en seres humanos y al mismo tiempo una estrecha ventana terapéutica.

50 Se espera que la prolongación de la semivida plasmática y la biodisponibilidad aumentada a través de la fusión con la albúmina de cómo resultado un perfil de seguridad y de eficacia mejorados. Esto significa que los niveles plasmáticos terapéuticos pueden conseguirse y mantenerse con dosis más bajas y/o intervalos de dosis más largos, evitando niveles máximos por encima del umbral tóxico. En la actualidad, Neumega® es el único fármaco autorizado para el tratamiento de la trombocitopenia inducida por quimioterapia, lo que representa un campo con una alta necesidad médica no satisfecha. Neumega® muestra una alta frecuencia de efectos tóxicos, tales como edema e irregularidades cardiovasculares, junto con una baja eficacia especialmente en los casos graves de trombocitopenia.

Sumario de la invención

5 La invención se refiere a proteínas que comprenden IL-11 fusionada a la albúmina o a fragmentos de la misma. En el presente documento, estas proteínas de fusión se denominan conjuntamente "proteínas de fusión a albúmina de la invención". Estas proteínas de fusión de la invención muestran una semivida *in vivo* prolongada y/o una actividad terapéutica prolongada en comparación con la IL11 no fusionada.

10 La invención incluye kits, formulaciones, composiciones farmacéuticas, composiciones y proteínas de fusión a albúmina terapéuticas. La invención también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión a albúmina de la invención, así como vectores que contienen estos ácidos nucleicos, células huésped transformadas con estos ácidos nucleicos y vectores, y procedimientos de fabricación de las proteínas de fusión a albúmina de la invención que utilizan estos ácidos nucleicos, vectores, y/o células huésped.

15 La invención también se refiere a composiciones y a procedimientos para la terapia y la prevención de la trombocitopenia. La invención se refiere adicionalmente a composiciones y a procedimientos para la terapia y la prevención antiinflamatoria. Además, la invención se refiere a composiciones y a procedimientos para la terapia y la prevención de la enfermedad de von Willebrand.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1. Concentración plasmática de IL-11 tras la administración intravenosa a conejos de rhIL-11 o fusión de albúmina- IL-11 C-terminal.
- Figura 2. Concentración plasmática de IL-11 tras la administración subcutánea a conejos de rhIL-11 o fusión de albúmina - IL-11 C-terminal
- Figura 3. Concentración plasmática de IL-11 tras la administración intravenosa a ratas de rhIL-11 o fusión de albúmina - IL-11 N-terminal
- Figura 4. Concentración plasmática de IL-11 tras la administración subcutánea a ratas de rhIL-11 o fusión de albúmina - IL-11 N-terminal
- Figura 5. Trayectoria de los niveles de plaquetas después del tratamiento de ratas sin tratamiento previo con IL-11
- Figura 6. Trayectoria de los niveles de plaquetas después del tratamiento de ratas sometidas a quimioterapia con IL-11
- Figura 7. Desarrollo del peso corporal (en % del valor basal) tras la aplicación de IL-11 en un modelo de ratón para la EII
- Figura 8. Puntuación de la observación visual (diarrea y sangrado rectal macroscópico) tras la aplicación de IL-11 en un modelo de ratón para la EII
- Figura 9. Longitud del colon tras la aplicación de IL-11 en un modelo de ratón para la EII
- Figura 10. Puntuación de la enfermedad histológica tras la aplicación de IL-11 en un modelo de ratón para la EII
- Figura 11. Gel de SDS y transferencias de Western de diversos compuestos de la invención

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden albúmina acoplada a IL-11. Tales péptidos incluyen, pero sin limitación, péptidos de unión al complejo receptor de gp130. Estos péptidos incluyen IL-11, o fragmentos de la misma, que tienen propiedades trombocitopoyéticas o antiinflamatorias.

Los términos "proteína" y "péptido", como se utilizan en este documento, no son limitativos e incluyen proteínas y polipéptidos, así como péptidos.

Además, entidades químicas pueden unirse covalentemente a las proteínas de fusión de la invención o utilizarse en combinaciones para mejorar una actividad biológica o para modular una actividad biológica.

25 Se espera que las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención prolonguen la semivida de la IL-11 *in vivo*. La semivida *in vivo* o *in vitro* de dicho péptido/proteína fusionado a albúmina se prolonga 2 veces, o 5 veces, o más, en comparación con la semivida del péptido/proteína que carece de albúmina unida. Además, se espera que las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención reduzcan la frecuencia del programa de dosificación del péptido IL-11. La frecuencia del programa de dosificación se reduce al menos una cuarta parte, o al menos la mitad,

o más, en comparación con la frecuencia del programa de dosificación del péptido IL-11 que carece de albúmina unida.

5 Se espera que las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención prolonguen la vida útil del péptido, y/o estabilicen el péptido y/o su actividad en solución (o en una composición farmacéutica) *in vivo* y/o *in vitro*. Se espera que estas proteínas de fusión a albúmina, que pueden ser agentes terapéuticos, reduzcan la necesidad de formular soluciones de proteínas con grandes excesos de proteínas transportadoras (tales como albúmina, no fusionada) para evitar la pérdida de proteínas debido a factores tales como la unión no específica. Una semivida aumentada se define como una semivida que es al menos 2 veces mayor (preferentemente al menos 5, 10, 20 o 30 veces mayor) que la del compuesto de IL-11 no fusionado, cuando se mide durante las primeras 24 horas después de la inyección subcutánea de acuerdo con el Ejemplo 4, indicado más adelante, en ratas Wistar macho de 6 meses de vida.

10 La presente invención también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión a albúmina así como vectores que contienen estos ácidos nucleicos, células huésped transformadas con estos vectores de ácido nucleico, y procedimientos de fabricación de las proteínas de fusión a albúmina de la invención que utilizan estos ácidos nucleicos, vectores, y/o células huésped. La presente invención incluye adicionalmente organismos transgénicos modificados para contener las moléculas de ácido nucleico de la invención, opcionalmente modificados para expresar las proteínas de fusión a albúmina codificadas por las moléculas de ácido nucleico.

15 La presente invención también incluye formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de albúmina de la invención y un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales formulaciones pueden estar en un kit o recipiente. Tal kit o recipiente puede envasarse con instrucciones relativas a la vida útil prolongada de la proteína. Tales formulaciones pueden utilizarse en procedimientos de prevención, tratamiento, mejora de la trombocitopenia o de enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis reumatoide, enfermedad de von Willebrand, etc., u otros trastornos en un paciente, tal como un mamífero, o un ser humano, que comprende la etapa de administrar la formulación farmacéutica al paciente.

20 La invención también incluye un procedimiento para minimizar potencialmente los efectos secundarios (por ejemplo, reacción en el sitio de inyección, aumento del volumen plasmático, arritmia, cefalea, náuseas, fiebre, exantema, astenia, diarrea, mareo, reacciones alérgicas) asociados con el tratamiento de un mamífero con citocinas en concentraciones moderadamente altas que comprende administrar, a dicho mamífero, una citocina de la invención fusionada con albúmina.

25 La presente invención incluye un procedimiento para prevenir, tratar o mejorar la trombocitopenia o enfermedades inflamatorias, tales como enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis reumatoide, etc., que comprende administrar a un mamífero, en el que se desea tal tratamiento preventivo o mejora, una proteína de fusión de albúmina de la invención que comprende un péptido/proteína IL-11 (o fragmento de la misma) en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o mejorar la enfermedad o el trastorno. En la presente invención, la IL-11 también se denomina "proteína terapéutica".

30 La presente invención incluye proteínas de fusión a albúmina que comprenden IL-11 (que incluye fragmentos de la misma) fusionada a albúmina o a copias múltiples de albúmina (incluyendo fragmentos de la misma).

35 La presente invención también incluye un procedimiento para prolongar la semivida de la IL-11 en un mamífero. El procedimiento implica unir la IL-11 a una albúmina para formar una IL-11 fusionada con albúmina y la administración a un mamífero de la IL-11 fusionada con albúmina. Típicamente, la semivida de la IL-11 fusionada con albúmina puede prolongarse al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces o al menos 50 veces en comparación con la semivida de la IL-11 que carece de la albúmina unida.

40 En el presente documento se ilustran proteínas de fusión que comprenden albúmina fusionada a IL-11. La presente invención también incluye un procedimiento de fabricación mejorado de un resto terapéutico en comparación con lo disponible en la técnica. Por ejemplo, la presente invención proporciona un medio de fabricación mejorado de una proteína con el resto activo de IL-11. Más adelante se analizan, con más detalle, diversos aspectos de la presente invención.

Albúmina

45 Las expresiones seroalbúmina humana (SAH) y albúmina humana (AH) se utilizan indistintamente en este documento. Los términos "albúmina" y "seroalbúmina" son más amplios, e incluyen la seroalbúmina humana (y fragmentos de la misma), así como la albúmina de otras especies (y fragmentos de la misma).

50 Tal como se utiliza en el presente documento, "albúmina" se refiere en su conjunto a la secuencia de aminoácidos o a la proteína albúmina, o a un fragmento de albúmina que tiene una o más de las actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de la albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a la albúmina humana o a fragmentos de la misma (véanse los documentos EP 201 239, EP322 094 y WO 97/24445), especialmente la forma madura de la albúmina humana como se muestra en la Tabla 1 y en la SEC ID N°:18 de los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480.

En particular, las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de la albúmina humana y fragmentos de la albúmina humana.

Proteínas de fusión a albúmina

5 La presente invención se refiere en general a proteínas de fusión a albúmina y a procedimientos para tratar, prevenir o mejorar enfermedades o trastornos. Tal como se utiliza en este documento, "proteína de fusión a albúmina" se refiere a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de albúmina (o un fragmento de la misma) a al menos una molécula de una proteína IL-11 (o fragmento de la misma). Una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento de una proteína IL-11 y al menos un fragmento de seroalbúmina humana, que se asocian entre sí, tal como por fusión genética entre sí (es decir, la proteína de fusión de albúmina se genera por traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica toda o una parte de una proteína IL-11 se une en fase de lectura con un polinucleótido que codifica toda o una parte de la albúmina). La proteína IL-11 y la proteína albúmina, una vez formando parte de la proteína de fusión a albúmina, puede denominarse como una "parte", "región" o "resto" de la proteína de fusión a albúmina.

15 En una realización la proteína de fusión de albúmina comprende AH como la parte N-terminal, y una proteína IL-11 como la parte C-terminal. De manera alternativa, también puede utilizarse una proteína de fusión de albúmina que comprende AH como la parte C-terminal, y una proteína IL-11 como la parte N-terminal.

Adicionalmente, las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden incluir un péptido engarzador entre las partes fusionadas para proporcionar una mayor separación física entre los restos y así maximizar la accesibilidad de la parte de proteína IL-11, por ejemplo, para la unión a su receptor afín. El péptido engarzador puede consistir en aminoácidos de tal manera que sea más flexible o más rígido.

20 Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden tener la siguiente fórmula R2-R1; R1-R2; R2-R1-R2; R2-L-R1-L-R2; R1-L-R2; R2-L-R1; o R1-L-R2-L-R1, en la que R1 es al menos una secuencia de proteína, péptido o polipéptido de IL-11 (que incluye fragmentos de los mismos), L es un engarce y R2 es una secuencia de seroalbúmina (que incluye fragmentos de la misma). Engarces que sirven como ejemplo incluyen (GGGGG)_N (SEC ID N°:8) o (GGGS)_N (SEC ID N°:9) o (SGG)_N, en las que N es un número entero mayor o igual que 1 y en las que G representa glicina y S representa serina.

30 En realizaciones adicionales, las proteínas de fusión a albúmina de la invención comprenden una proteína IL-11 que tiene una vida útil o una semivida *in vivo* o una actividad terapéutica prolongada en comparación con la vida útil o la semivida *in vivo* o la actividad terapéutica de la misma proteína IL-11 cuando no está fusionada a la albúmina. La vida útil se refiere típicamente al período de tiempo durante el cual la actividad terapéutica de una proteína IL-11 en solución o en alguna otra formulación de almacenamiento, es estable sin pérdida indebida de actividad terapéutica.

35 Las proteínas de fusión a albúmina de la invención con una vida útil "prolongada" o "alargada" muestran mayor actividad terapéutica con respecto a un prototipo que se ha sometido a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación. El prototipo puede ser la proteína IL-11 de longitud completa no fusionada. A modo de ejemplo, una proteína de fusión de albúmina de la invención puede conservar más de aproximadamente un 100% de la actividad terapéutica, o más de aproximadamente un 105%, 110%, 120%, 130%, 150% o 200% de la actividad terapéutica de un prototipo cuando se somete a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación que el prototipo cuando se compara en un momento determinado. Sin embargo, cabe señalar que la actividad terapéutica depende de la estabilidad de la proteína IL-11, y puede ser inferior al 100%.

40 La vida útil también puede evaluarse en cuanto a la actividad terapéutica que queda tras el almacenamiento, normalizada con respecto a la actividad terapéutica cuando se inició el almacenamiento. Las proteínas de fusión a albúmina de la invención con vida útil prolongada o alargada, mostrada por la actividad terapéutica prolongada o alargada, puede conservar más de aproximadamente el 50% de la actividad terapéutica, aproximadamente el 60%, 70%, 80%, ó 90% o más de la actividad terapéutica de la proteína IL-11 no fusionada equivalente cuando se somete a las mismas condiciones.

Como se ha indicado anteriormente, una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento de una proteína IL-11 y al menos un fragmento de seroalbúmina humana, que se asocian entre sí por fusión genética.

50 Tal como se utiliza en este documento, "proteína terapéutica" se refiere a la IL-11, o a fragmentos de la misma, que tienen una o más actividades terapéuticas y/o biológicas. De esta manera una proteína de fusión de albúmina de la invención puede contener al menos un fragmento de una proteína IL-11. Adicionalmente, la expresión "proteína terapéutica" puede referirse al equivalente endógeno o de origen natural de una proteína IL-11 que incluye los equivalentes endógenos o de origen natural de una proteína IL-11.

55 Por un polipéptido IL-11 que presenta una "actividad terapéutica" o una proteína que es "terapéuticamente activa" se entiende un polipéptido IL-11 que posee una o más actividades terapéuticas y/o biológicas conocidas asociadas con una proteína IL-11 tal como una o más de las proteínas IL-11 descritas en el presente documento o conocidas de otra manera en la técnica. Como ejemplo no limitativo, una proteína IL-11 es una proteína que es útil para tratar,

prevenir o mejorar una enfermedad, condición o trastorno".

Tal y como se utiliza en el presente documento, "actividad terapéutica" o "actividad" puede referirse a una actividad cuyo efecto está en consonancia con un resultado terapéutico deseable en seres humanos, o con los efectos deseados en mamíferos no humanos o en otras especies u organismos. La actividad terapéutica puede medirse *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, un efecto deseable puede someterse a ensayo en cultivo celular. Tales ensayos en cultivo celular o *in vitro* están comúnmente disponibles para muchas proteínas terapéuticas como se describe en la técnica.

Las proteínas terapéuticas correspondientes a una parte de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención pueden modificarse uniendo uno o más grupos de oligosacáridos. La modificación, denominada glucosilación, puede influir drásticamente en las propiedades físicas de las proteínas y puede ser importante en la estabilidad, secreción y localización de las proteínas. Tales modificaciones se describen con detalle en los documentos WO 03/066824 y WO01/79480, que se incorporan en el presente documento por referencia.

Las proteínas terapéuticas correspondientes a una parte de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, así como sus análogos, pueden modificarse de manera que la glucosilación en uno o más sitios se modifique como resultado de la manipulación(o manipulaciones) de su secuencia de ácido nucleico, por la célula huésped en la que se expresan, o debido a otras condiciones de su expresión. Por ejemplo, pueden producirse isómeros de glucosilación por supresión o introducción de sitios de glucosilación, por ejemplo, por sustitución o delección de restos de aminoácidos, tal como la sustitución de glutamina por asparagina, o pueden producirse proteínas recombinantes no glucosiladas por expresión de las proteínas en las células huésped que no las glucosilarán, por ejemplo, en *E. coli* o en levaduras que carecen de glucosilación. Ejemplos de estas estrategias se describen con mayor detalle en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480, conocidos en la técnica.

En diversas realizaciones, las proteínas de fusión a albúmina de la invención son capaces de una actividad terapéutica y/o actividad biológica correspondiente a la actividad terapéutica y/o actividad biológica de la proteína terapéutica correspondiente a la parte de proteína terapéutica de la fusión con la albúmina. En realizaciones adicionales, las partes de proteína terapéuticamente activa de las proteínas de fusión a albúmina de la invención son fragmentos de la secuencia de referencia y son capaces de la actividad terapéutica y/o actividad biológica de la proteína terapéutica correspondiente.

Fragmentos y variantes de polinucleótidos y polipéptidos

Fragmentos

La presente invención se refiere adicionalmente a fragmentos de las proteínas terapéuticas, a proteínas de albúmina, y/o a proteínas de fusión a albúmina de la invención.

Por consiguiente, los fragmentos de una proteína terapéutica correspondientes a una parte de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, incluyen la proteína de longitud completa así como los polipéptidos que tienen uno o más restos delecionados del extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se incluyen en la invención.

Adicionalmente, los fragmentos de polipéptidos de seroalbúmina correspondientes a una parte de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, incluyen la proteína de longitud completa así como los polipéptidos que tienen uno o más restos delecionados del extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia (es decir, la seroalbúmina). Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se incluyen en la invención.

Además, los fragmentos de proteínas de fusión a albúmina de la invención incluyen la proteína de fusión de albúmina de longitud completa, así como los polipéptidos que tienen uno o más restos delecionados del extremo amino terminal de la proteína de fusión a albúmina. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se incluyen en la invención.

La presente invención proporciona adicionalmente polipéptidos que tienen uno o más restos delecionados del extremo carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-11 correspondiente a una parte de proteína IL-11 de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se incluyen en la invención.

Adicionalmente, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen uno o más restos delecionados del extremo carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos de una proteína albúmina correspondiente a una parte de la proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención (por ejemplo, seroalbúmina). Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se incluyen en la invención.

Además, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen uno o más restos delecionados del extremo carboxilo terminal de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los polinucleótidos que codifican estos

polipéptidos también se incluyen en la invención.

Adicionalmente, cualquiera de las deleciones N-terminal o C-terminal anteriormente descritas pueden combinarse para producir un polipéptido de referencia delecionado en el extremo N-terminal y C-terminal (por ejemplo, una proteína terapéutica a la que se hace referencia en la Tabla 1, o una seroalbúmina (por ejemplo, la SEC ID N°:18), o una proteína de fusión de albúmina de la invención). La invención también proporciona polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos delecionados de los extremos amino y carboxilo terminales. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se incluyen en la invención.

La presente solicitud también se refiere a proteínas que contienen polipéptidos idénticos al menos un 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una secuencia de polipéptido de referencia (por ejemplo, una proteína terapéutica, proteína seroalbúmina o una proteína de fusión de albúmina de la invención) expuesta en el presente documento, o fragmentos de la misma. En algunas realizaciones, la solicitud se refiere a proteínas que comprenden polipéptidos idénticos al menos un 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los polipéptidos de referencia que tienen la secuencia de aminoácidos de las deleciones N- y C-terminal como se ha descrito anteriormente. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se incluyen en la invención.

Otros fragmentos de polipéptidos de la invención son fragmentos que comprenden, o de manera alternativa, que consisten en, una secuencia de aminoácidos que presenta una actividad terapéutica y/o actividad funcional (por ejemplo, actividad biológica) de la secuencia de polipéptidos de la proteína seroalbúmina o IL-11 de la cual la secuencia de aminoácidos es un fragmento.

Otros fragmentos de polipéptidos son fragmentos biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos son aquellos que presentan una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del polipéptido de la presente invención. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una mejora de la actividad deseada, o una disminución de la actividad no deseable.

Las variantes de polinucleótidos de la invención pueden contener modificaciones en las regiones codificantes, en las regiones no codificantes, o en ambas. Las variantes de polinucleótidos incluyen las que contienen modificaciones que producen sustituciones silenciosas, pero no modifican las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Tales variantes de nucleótidos pueden producirse por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Las variantes de polipéptidos incluyen aquellas en las se sustituyen menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, o 5-50, 5-25, 5-10, 1-5, ó 1-2 aminoácidos, en cualquier combinación. Pueden producirse variantes de polinucleótidos por diversas razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped microbiano, tal como, levaduras o *E. coli*).

En otra realización, un polinucleótido que codifica una parte de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención se optimiza para la expresión en células de mamífero o levadura. En una realización adicional, un polinucleótido que codifica una parte de proteína IL-11 de una proteína de fusión de albúmina de la invención se optimiza para la expresión en células de mamífero o levadura. En otra realización adicional, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se optimiza para la expresión en células de mamífero o levadura.

Las variantes de origen natural se denominan "variantes alélicas" y se refieren a una de las diversas formas alternativas de un gen que ocupa un determinado locus en un cromosoma de un organismo. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York. (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar a nivel de polinucleótido y/o de polipéptido y se incluyen en la presente invención. De manera alternativa, pueden producirse variantes de origen no natural por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

Utilizando procedimientos conocidos de tecnología de ADN recombinante y de modificación por ingeniería genética de proteínas, pueden generarse variantes para mejorar o modificar las características de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, pueden delecionarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido de la presente invención sin pérdida sustancial de la función biológica. Véase, por ejemplo, Ron y col., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993) (variantes de KGF) y Dobeli y col, J. Biotechnology 7:199-216 (1988) (variantes de interferón gamma).

Además, incluso si la deleción de uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas, todavía pueden conservarse otras actividades biológicas.

En otras realizaciones, las variantes de la invención tienen sustituciones conservativas. Por "sustituciones conservativas" se entiende permutas dentro de los grupos tales como la sustitución de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; sustitución de los restos hidroxilo Ser y Thr; sustitución de los restos ácidos Asp y Glu; sustitución de los restos amida Asn y Gln; sustitución de los restos básicos Lys, Arg, e His; sustitución de los restos aromáticos Phe, Tyr, Trp y, sustitución de los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met, y Gly.

La orientación sobre cómo hacer sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas se proporciona, por ejemplo, en Bowie y col, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science 247:1306-1310 (1990), en el que los autores indican que existen dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos a cambiar.

5 Como afirman los autores, las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores también indican que es probable que los cambios de aminoácidos sean permisivos en determinadas posiciones de aminoácidos en la proteína. Por ejemplo, la mayoría de los restos de aminoácidos internos (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, al tiempo que por lo general se conservan algunas de las características de las cadenas laterales de superficie. Además, las sustituciones de aminoácidos conservativas toleradas implican la sustitución de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; la sustitución de los restos hidroxilo Ser y Thr; la sustitución de los restos ácidos Asp y Glu; la sustitución de los restos amida Asn y Gln, la sustitución de los restos básicos Lys, Arg, y His; la sustitución de los restos aromáticos Phe, Tyr, Trp y la sustitución de los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met, y Gly. Además, entidades químicas pueden unirse covalentemente a las proteínas de fusión a albúmina para mejorar o modular una actividad funcional o biológica específica tal como mediante procedimientos descritos en Current Opinions in Biotechnology, 10:324 (1999). Modificaciones adicionales post-traduccionales incluidas en la invención son, por ejemplo, cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, el procesamiento de los extremos N-terminal o C-terminal, la unión de restos químicos a la cadena principal de aminoácidos, modificaciones químicas de las cadenas de carbohidratos unidas al N o unidas al O, y la adición o delección de un resto de metionina N-terminal como resultado de la expresión de la célula huésped procarionta. Las proteínas de fusión a albúmina también pueden modificarse, por ejemplo, pero sin limitación, con un agente quimioterapéutico, tal como un fármaco, y/o un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico y/o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento de la proteína. Ejemplos de tales modificaciones se proporcionan, por ejemplo, en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (págs. 105-106).

25 **Actividad funcional**

"Un polipéptido que tiene actividad funcional" se refiere a un polipéptido IL-11 capaz de presentar una o más actividades funcionales conocidas asociadas con la longitud completa, pro-proteína, y/o la forma madura de una proteína IL-11. Tales actividades funcionales incluyen, pero no sin limitación, actividad biológica, antigenicidad (capacidad de unirse (o competir con un polipéptido para la unión) a un anticuerpo anti-polipéptido), inmunogenicidad (capacidad de generar anticuerpos que se unen a un polipéptido específico de la invención), la capacidad para formar multímeros con polipéptidos de la invención, y la capacidad de unirse a un receptor o ligando para un polipéptido.

35 "Un polipéptido que tiene actividad biológica" se refiere a un polipéptido que presenta una actividad similar a, pero no necesariamente idéntica a, una actividad de una proteína IL-11 de la presente invención, que incluye las formas maduras, medidas en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en el que existe dependencia de la dosis, no tiene que ser idéntica a la del polipéptido, sino más bien sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una determinada actividad en comparación con el polipéptido de la presente invención.

En otras realizaciones, una proteína de fusión de albúmina de la invención tiene al menos una actividad biológica y/o terapéutica asociada con la proteína IL-11 (o un fragmento de la misma) cuando no está fusionada a la albúmina.

40 Las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden someterse a ensayo para determinar su actividad funcional (por ejemplo, actividad biológica) utilizando o modificando rutinariamente ensayos conocidos en la técnica, así como los ensayos descritos en el presente documento. Concretamente, las proteínas de fusión a albúmina pueden someterse a ensayo para verificar su actividad funcional. Además, un experto en la materia puede someter a ensayo de forma rutinaria fragmentos de una proteína IL-11 correspondientes a una parte de proteína IL-11 de una proteína de fusión de albúmina de la invención, para determinar su actividad utilizando ensayos de actividad de IL-11. Además, un experto en la materia puede someter a ensayo de forma rutinaria fragmentos de una proteína albúmina correspondientes a una parte de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, para determinar su actividad utilizando ensayos conocidos en la técnica y/o como se describe en la sección de Ejemplos en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480.

50 Adicionalmente, los ensayos descritos en el presente documento (véanse los Ejemplos y la Tabla 1) y también conocidos en la técnica pueden aplicarse de forma rutinaria para medir la capacidad de las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención y fragmentos de las mismas para provocar una actividad biológica y/o actividad terapéutica (ya sea *in vivo* o *in vitro*) relacionada con la parte de proteína IL-11 y/o la parte de albúmina de la proteína de fusión de albúmina de la presente invención. El experto en la materia conocerá otros procedimientos y se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

Expresión de proteínas de fusión

Las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden producirse como moléculas recombinantes por secreción a partir de levaduras, un microorganismo tal como una bacteria, o una línea celular humana o animal.

Opcionalmente, las células huésped secretan el polipéptido.

Para la expresión de las proteínas de fusión a albúmina ilustradas en el presente documento, se utilizaron con éxito cepas de levadura con alteración del gen *HSP150* como se ilustra en el documento WO 95/33833, o cepas de levadura con alteración del gen *PMT1* como se ilustra en el documento WO 00/44772 (que sirve para reducir/eliminar la glucosilación unida a O de las fusiones a albúmina), o cepas de levadura con alteración del gen *YAP3* como se ilustra en el documento WO 95/23857, en combinación con el promotor *PRB1* de levadura, la secuencia líder de fusión de *ASH/MF α -1* ilustrada en el documento WO 90/01063, el terminador *ADH1* de levadura, el marcador de selección *LEU2* y el vector de disgregación pSAC35 ilustrados en el documento US 5.637.504.

Otras cepas de levadura, promotores, secuencias líder, terminadores, marcadores y vectores que se espera que sean útiles en la invención se describen en los documentos WO 03/066824 y WO 01/74980 (págs. 94-99).

La presente invención también incluye una célula, opcionalmente una célula de levadura transformada para expresar una proteína de fusión de albúmina de la invención. Además de las propias células huésped transformadas, la presente invención también contempla un cultivo de esas células, opcionalmente un cultivo monoclonal (clonalmente homogéneo), o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente. Si el polipéptido se secreta, el medio contendrá el polipéptido, con las células, o sin las células si se han eliminado por filtración o centrifugación. Se conocen y pueden utilizarse muchos sistemas de expresión, que incluyen bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*), hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insecto.

La proteína deseada se produce de manera convencional, por ejemplo a partir de una secuencia codificante insertada en el cromosoma del huésped o en un plásmido libre. Las levaduras se transforman con una secuencia codificante para la proteína deseada de cualquiera de las maneras habituales, por ejemplo electroporación. Procedimientos para la transformación de levaduras por electroporación se describen en Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182.

Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, pueden identificarse mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, pueden cultivarse las células resultantes de la introducción de una construcción de expresión para que produzcan el polipéptido deseado. Las células pueden recogerse y someterse a lisis y puede examinarse su contenido de ADN para determinar la presencia del ADN utilizando un procedimiento tal como el descrito por Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 o Berent y col. (1985) *Biotech.* 3, 208. De manera alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante puede detectarse utilizando anticuerpos.

Vectores de plásmido de levadura útiles incluyen pRS403-406 y pRS413-416 y están en general disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Estados Unidos. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integradores de levadura (Ylps), e incorporan los marcadores de selección de levadura *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (YCps).

Los vectores para fabricar proteínas de fusión a albúmina para la expresión en levaduras incluyen pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA y PC4:HSA, que se depositaron el 11 de abril de 2001 en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, 20110-2209 y que se describen en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480.

Otro vector que se espera que sea útil para expresar una proteína de fusión de albúmina en levaduras es el vector pSAC35 que se describe en Sleep y col., *BioTechnology* 8:42 (1990). El plásmido pSAC35 es de la clase de vector de disgregación descrito en el documento US 5.637.504.

Se han desarrollado diversos procedimientos para unir operativamente ADN a vectores a través de términos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de ADN pueden añadirse regiones homopoliméricas complementarias para insertar en el ADN vectorial. Después, el vector y el segmento de ADN se unen mediante enlaces de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Los engarces sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un procedimiento alternativo para unir el segmento de ADN a vectores. El segmento de ADN, generado por digestión con endonucleasas de restricción, se trata con la ADN polimerasa del bacteriófago T4 o con la ADN polimerasa I de *E. coli*, que son enzimas que eliminan salientes, los extremos 5' terminales monocatenarios con sus actividades 3'-5' exonucleolíticas y rellenan los extremos 3' cohesivos con sus actividades de polimerización. Por lo tanto, la combinación de estas actividades genera segmentos de ADN de extremos romos. A continuación, los segmentos de extremos romos se incuban con un gran exceso molar de moléculas engarzadoras en presencia de una enzima que es capaz de catalizar el ligamiento de las moléculas de ADN de extremos romos, tales como la ADN ligasa del bacteriófago T4. De esta manera, los productos de la reacción son segmentos de ADN que portan secuencias engarzadoras poliméricas en sus extremos. A continuación, estos segmentos de ADN se escinden con la enzima de restricción apropiada y se ligan a un vector de expresión que se ha escindido con una enzima que produce extremos terminales compatibles con los del segmento de ADN.

Engarces sintéticos que contienen una diversidad de sitios de endonucleasas de restricción están comercialmente disponibles en una serie de fuentes comerciales.

5 Géneros de levadura que sirven como ejemplo, contemplados para resultar útiles en la realización práctica de la presente invención como huéspedes para la expresión de las proteínas de fusión a albúmina son *Pichia* (anteriormente clasificada como *Hansenula*), *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Zygosaccharomyces*, *Debaromyces*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Humicola*, *Mucor*, *Neurospora*, *Yarrowia*, *Metschnikowia*, *Rhodosporidium*, *Leucosporidium*, *Botryosclerotium*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, y similares. Los géneros incluyen los seleccionados del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulaspora*. Son ejemplos de
10 *Saccharomyces spp.*, *S. cerevisiae*, *S. italicus* y *S. rouxii*. Ejemplos de otras especies, y procedimientos para transformarlas, se describen en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (págs. 97-98).

Los procedimientos para la transformación de *S. cerevisiae* se muestran en general en los documentos EP 251 744, EP 258 067 y WO 90/01063. Promotores adecuados para *S. cerevisiae* incluyen los asociados con el gen *PGKI*, los genes *GAL1* o *GAL10*, *CYCI*, *PHO5*, *TRPI*, *ADHI*, *ADH2*, los genes para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoglucoasa isomerasa, glucoquinasa, feromona de factor de acoplamiento alfa (una feromona de factor de acoplamiento), el promotor *PRB1*, el promotor *GUT2*, el promotor *GPD1*, y promotores híbridos que implican híbridos de partes de regiones reguladoras 5' con partes de regiones reguladoras 5' de otros promotores o con sitios de activación aguas arriba (por ejemplo, el promotor del documento EP-A-258 067).

20 Promotores regulables convenientes para su uso en *Schizosaccharomyces pombe* son el promotor reprimible por tiamina del gen *nmt* como se describe en Maundrell (1990) J. Biol. Chem. 265, 10857-10864 y el promotor reprimible por glucosa del gen *jbpl* como se describe en Hoffman & Winston (1990) Genetics 124, 807-816.

Procedimientos para transformar *Pichia* para la expresión de genes extraños se muestran, por ejemplo, en Cregg y col. (1993), y en diversas patentes de Phillips (por ejemplo, el documento US 4 857 467, y existen kits para la expresión en *Pichia* comercialmente disponibles en Invitrogen BV, Leek, Países Bajos, e Invitrogen Corp., San Diego, California. Promotores adecuados incluyen AOX1 y AOX2. Gleeson y col. (1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465 incluyen información sobre la transformación y los vectores de *Hansenula*, siendo promotores adecuados *MOX1* y *FMD1*; mientras que el documento EP 361 991, Flier y col. (1991) y otras publicaciones de Rhone-Poulenc Rorer muestran cómo expresar proteínas extrañas en *Kluyveromyces spp.*

30 La señal de terminación de la transcripción puede ser la secuencia flanqueante 3' de un gen eucariota que contiene señales apropiadas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Secuencias flanqueantes 3' adecuadas pueden ser, por ejemplo, las del gen unido de manera natural a la secuencia de control de expresión utilizada, es decir, pueden corresponder al promotor. De manera alternativa, pueden ser diferentes en cuyo caso se utiliza opcionalmente la señal de terminación del gen *ADHI* de *S. cerevisiae*.

35 La proteína de fusión de albúmina deseada puede expresarse inicialmente con una secuencia líder de secreción, que puede ser cualquier líder eficaz en la levadura seleccionada. Líderes útiles en *S. cerevisiae* incluyen los del polipéptido del factor de acoplamiento (*MF α -1*) y los líderes híbridos del documento EP-A-387 319. Tales líderes (o señales) se escinden por la levadura antes de la liberación de la albúmina madura en el medio circundante. Otros líderes de este tipo incluyen los de la invertasa de *S. cerevisiae* (*SUC2*) desvelados en el documento JP 62-096086 (concedida como 911036516), la fosfatasa ácida (*PHO5*), la pre-secuencia de *MF α -1*, β -glucanasa (*Bgl2*) y la toxina destructora; glucoamilasa II de *S. diastaticus*; α -galactosidasa de *S. carlsbergensis* (*MEL1*); la toxina destructora de *K. lactis*, y la glucoamilasa de *Candida*.

Procedimientos adicionales de producción recombinante y sintética de proteínas de fusión a albúmina

45 La presente invención incluye polinucleótidos que codifican proteínas de fusión a albúmina de la invención, así como vectores, células huésped y organismos que contienen estos polinucleótidos. La presente invención también incluye procedimientos para producir proteínas de fusión a albúmina de la invención mediante técnicas sintéticas y recombinantes. Los polinucleótidos, vectores, células huésped y organismos pueden aislarse y purificarse mediante procedimientos conocidos en la técnica

50 Un vector útil en la invención puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, cósmido, mini-cromosoma, vector viral o retroviral. Los vectores que pueden utilizarse para clonar y/o expresar polinucleótidos de la invención son vectores que son capaces de replicarse y/o de expresar los polinucleótidos en la célula huésped en la que se desean replicar y/o expresar los polinucleótidos. En general, los polinucleótidos y/o vectores pueden utilizarse en cualquier célula, ya sea eucariota o procariota, incluyendo células de mamíferos (por ejemplo, células humanas (por ejemplo, HeLa), de mono (por ejemplo, Cos), de conejo (por ejemplo, reticulocitos de conejo), de rata, de hámster (por ejemplo, CHO, NSO y células renales de cría de hámster) o de ratón (por ejemplo, células L), células vegetales, células de levadura, células de insectos o células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*). Véanse, por ejemplo, F. Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (1992) y Sambrook y col., (1989) para ejemplos de vectores apropiados para diversos tipos de células huésped. Advuértase, sin embargo, que
55

cuando se utiliza un vector retroviral de replicación defectuosa, se producirá generalmente la propagación viral sólo en las células huésped de complementación.

Las células huésped que contienen estos polinucleótidos pueden utilizarse para expresar grandes cantidades de la proteína útil, por ejemplo, en productos farmacéuticos, reactivos de diagnóstico, vacunas y productos terapéuticos. La proteína puede aislarse y purificarse mediante procedimientos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento.

Los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden unirse a un vector que contenga un marcador de selección para la propagación en un huésped. En general, puede introducirse un vector plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato cálcico, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede compactarse *in vitro* utilizando una línea celular de compactación apropiada y, a continuación, transducirse en las células huésped.

El inserto de polinucleótido debería estar unido operativamente a un promotor apropiado compatible con la célula huésped en la que el polinucleótido va a expresarse. El promotor puede ser un promotor fuerte y/o un promotor inducible. Ejemplos de promotores incluyen el promotor PL del fago lambda, los promotores *lac*, *trp*, *phoA* y *tac* de *E. coli*, los promotores temprano y tardío del SV40 y los promotores de las LTR retrovirales, por nombrar algunos. El experto en la materia conocerá otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán adicionalmente sitios para el inicio de la transcripción, terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos expresados por las construcciones pueden incluir un codón inicio de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) apropiadamente colocado en el extremo del polipéptido a traducir.

Como se ha indicado, los vectores de expresión pueden incluir por lo menos un marcador de selección. Tales marcadores incluyen la dihidrofolato reductasa, G418, glutamina sintasa, o genes de resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucariotas, y genes de resistencia a la tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*, células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (número de acceso de la ATCC 201178)); células de insecto tales como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*, células animales tales como CHO, COS, NSO, 293, y las células Bowes de melanoma, y células vegetales. En la técnica se conocen las condiciones y los medios de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente.

En una realización, los polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención pueden estar fusionados a secuencias de señal que dirigirán la localización de una proteína de la invención a compartimentos particulares de una célula procarionta o eucariota y/o dirigirán la secreción de una proteína de la invención de una célula procarionta o eucariota. Por ejemplo, en *E. coli*, puede desearse dirigir la expresión de la proteína al espacio periplásmico. Ejemplos de secuencias de señal o de proteínas (o fragmentos de las mismas) a las que las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden fusionarse con objeto de dirigir la expresión del polipéptido al espacio periplásmico de las bacterias incluyen, pero sin limitación, la secuencia de señal de *peIB*, la secuencia de señal de la proteína de unión a maltosa (PUM), la PUM, la secuencia de señal de *ompA*, la secuencia de señal de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* periplásmica, y la secuencia de señal de la fosfatasa alcalina. Diversos vectores se encuentran disponibles en el mercado para la construcción de proteínas de fusión que dirigirán la localización de una proteína, tal como la serie de vectores pMAL (particularmente la serie pMAL-p) disponible en New England Biolabs. En una realización específica, los polinucleótidos de proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden fusionarse a la secuencia de señal de la pectato liasa *peIB* para aumentar la eficacia de la expresión y la purificación de tales polipéptidos en bacterias Gram-negativas. Véanse las patentes de Estados Unidos N°: 5.576.195 y 5.846.818.

Ejemplos de péptidos de señal que pueden fusionarse a una proteína de fusión de albúmina de la invención con objeto de dirigir su secreción en células de mamífero incluyen, pero sin limitación, la secuencia de señal de MPIF-1 (por ejemplo, los aminoácidos 1-21 del número de acceso del GenBank AAB51134), la secuencia de señal de la estañocalcina (MLQNSAVLLLLVISASA, SEC ID N°:10) y una secuencia de señal consenso (MPTWAWWFLVLLLALWAPARG, SEC ID N°:11). Una secuencia de señal adecuada que puede utilizarse junto con sistemas de expresión de baculovirus es la secuencia de señal de gp67 (por ejemplo, aminoácidos 1-19 del número de acceso del GenBank AAA72759).

Pueden amplificarse vectores que utilizan glutamina sintasa (GS) o DHFR como marcadores de selección en presencia de los fármacos metionina, sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (por ejemplo, la línea celular de mieloma murino, NSO) que son negativas a glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de la glutamina sintasa también pueden funcionar en las células que expresan glutamina sintasa (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO)) proporcionando un inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno. Un sistema de expresión de la glutamina sintasa y sus componentes se detalla en las publicaciones PCT: WO87/04462, WO86/05807, WO89/01036, WO89/10404 y WO91/06657. Además, los vectores de expresión de la glutamina sintasa pueden obtenerse procedentes de Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y la producción de

anticuerpos monoclonales utilizando un sistema de expresión basado en GS en células de mieloma murino se describe en Bebbington *et al.*, *Bio/technology* 10:169 (1992) y en Biblia & Robinson *Biotechnol. Prog.* 11:01 (1995).

La presente invención también se refiere a células huésped que contienen construcciones de vectores, tales como las descritas en el presente documento, y adicionalmente comprende células huésped que contienen secuencias de nucleótidos de la invención que se asocian operativamente con una o más regiones de control heterólogas (por ejemplo, el promotor y/o el potenciador) utilizando técnicas conocidas en la materia. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero (por ejemplo, una célula humana derivada), o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. Puede seleccionarse una cepa huésped que module la expresión de las secuencias de genes insertadas, o modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. La expresión de determinados promotores puede aumentarse en presencia de determinados inductores; de esta manera puede controlarse la expresión del polipéptido obtenido mediante modificación por ingeniería genética. Además, las diferentes células huésped tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y modificación traduccional y post-traduccional (por ejemplo, fosforilación, escisión) de proteínas. Para garantizar el procesamiento y las modificaciones deseadas de la proteína extraña expresada pueden seleccionarse líneas celulares apropiadas.

La introducción de los ácidos nucleicos y construcciones de ácido nucleico de la invención en la célula huésped puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros procedimientos. Tales procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.*, *Basic Methods In Molecular Biology* (1986). Se contempla específicamente que los polipéptidos de la presente invención puedan, en efecto, expresarse por una célula huésped que carezca de vector recombinante.

Además de incluir células huésped que contengan la construcciones vectoriales analizadas en el presente documento, la invención también incluye células huésped primarias, secundarias, e inmortalizadas de origen vertebrado, particularmente de origen mamífero, que se han modificado por ingeniería genética para delecionar o sustituir material genético endógeno (por ejemplo, la secuencia codificante correspondiente a una proteína IL-11 puede sustituirse por una proteína de fusión de albúmina correspondiente a la proteína IL-11), y/o incluir material genético (por ejemplo, pueden incluirse secuencias de polinucleótidos heterólogos tales como, por ejemplo, una proteína de fusión de albúmina de la invención correspondiente a la proteína terapéutica). El material genético asociado operativamente con el polinucleótido endógeno puede activar, modificar y/o amplificar polinucleótidos endógenos. Además, pueden utilizarse técnicas conocidas en la materia para asociar operativamente polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, polinucleótidos que codifican una proteína albúmina, o un fragmento de la misma) y/o regiones de control heterólogas (por ejemplo, el promotor y/o el potenciador) con secuencias endógenas de polinucleótidos que codifican una proteína IL-11 mediante recombinación homóloga (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.641.670, WO 96/29411, WO 94/12650; Koller *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra *et al.*, *Nature* 342:435-438 (1989).

Ventajosamente, las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos conocidos que incluyen precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de interacción de carga hidrófoba y cromatografía de lectina. En algunas realizaciones, para la purificación puede emplearse la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC", por sus siglas en inglés).

En algunas realizaciones preferidas las proteínas de fusión a albúmina de la invención se purifican utilizando uno o más de los procedimientos de cromatografía enumerados anteriormente. En otras realizaciones, las proteínas de fusión a albúmina de la invención se purifican utilizando una o más de las siguientes columnas de cromatografía, columna Q Sepharose FF, columna SP Sepharose FF, columna Q Sepharose de alto rendimiento, columna Blue Sepharose FF, Blue Column, columna Fenil Sepharose FF, DEAE Sepharose FF, o columna de Metilo. "Sepharose" es una marca comercial.

Además, las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden purificarse utilizando el proceso descrito en el documento WO 00/44772. Un experto en la materia podría modificar fácilmente el proceso descrito en el mismo para su uso en la purificación de proteínas de fusión a albúmina de la invención.

Las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención pueden recuperarse a partir de: productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota, que incluye, por ejemplo, células de levadura, bacterias, plantas superiores, insectos, y mamíferos. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar o no glucosilados. Además, las proteínas de fusión a albúmina de la invención también pueden incluir un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos, como resultado de los procesos mediados por el huésped. De esta manera, es bien conocido en la técnica que la metionina N-terminal codificada por el codón de inicio de la traducción se elimina en general con una alta eficacia de cualquier proteína después de la traducción en todas las células eucariotas. Mientras que la metionina N-terminal en la mayoría de las proteínas también se elimina de forma eficaz en la mayoría de los procariotas, para algunas proteínas, este proceso de eliminación procariota es ineficaz,

dependiendo de la naturaleza del aminoácido al que la metionina N-terminal se une covalentemente.

Las proteínas de fusión a albúmina de la invención y los anticuerpos que se unen a una proteína terapéutica o fragmentos de la misma pueden fusionarse a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En una realización, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (Qiagen, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, California, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador "AH", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina gripal (Wilson y col., Cell 37:767 (1954)) y el marcador "FLAG".

Además, una proteína de fusión de albúmina de la invención puede conjugarse con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa como, por ejemplo, ²¹³Bi. Ejemplos de tales agentes se proporcionan en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (pág. 107).

Las proteínas de fusión a albúmina también puede unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación de polipéptidos que están unidos por, que se unen a, o que se asocian con las proteínas de fusión a albúmina de la invención. Tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

La invención también proporciona derivados químicamente modificados de las proteínas de fusión a albúmina de la invención que pueden proporcionar ventajas adicionales, tales como una mayor solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación del polipéptido, o una disminución de la inmunogenicidad (véase la patente de Estados Unidos N°4.179.337). Ejemplos que implican el uso de polietilenglicol se proporcionan en el documento WO 01/79480 (págs. 109-111).

La presencia y cantidad de proteínas de fusión a albúmina de la invención puede determinarse utilizando ELISA, un inmunoensayo bien conocido en la materia.

Usos de los polipéptidos

Cada uno de los polipéptidos identificados en el presente documento pueden utilizarse de numerosas formas. La siguiente descripción debe considerarse a modo de ejemplo y utiliza técnicas conocidas.

Las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención son útiles para el tratamiento, prevención y/o pronóstico de diversos trastornos en mamíferos, preferentemente en seres humanos. Tales trastornos incluyen, pero sin limitación, trombocitopenia, EVW y enfermedades inflamatorias, tales como EII.

Además, las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención pueden utilizarse para tratar o prevenir enfermedades o afecciones. Además, las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden utilizarse como una medida profiláctica. Las proteínas de fusión a albúmina pueden utilizarse para someter a ensayo niveles de polipéptidos en una muestra biológica. Las proteínas de fusión a albúmina de la invención también pueden utilizarse para generar anticuerpos, que a su vez pueden utilizarse para medir la expresión proteica de la proteína terapéutica, proteína albúmina, y/o la proteína de fusión de albúmina de la invención a partir de una célula recombinante, como una forma de evaluar la transformación de la célula huésped, o en una muestra biológica. Además, las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención pueden utilizarse para someter a ensayo las actividades biológicas descritas en el presente documento.

Organismos Transgénicos

Los organismos transgénicos que expresan las proteínas de fusión a albúmina de la invención también se incluyen en la invención. Los organismos transgénicos son organismos modificados genéticamente a los que se ha transferido material genético recombinante, exógeno o clonado. Tal material genético a menudo se denomina transgén. La secuencia de ácido nucleico del transgén puede incluir una o más secuencias reguladoras de la transcripción y otras secuencias de ácido nucleico, tales como intrones, que pueden ser necesarias para la secreción y la expresión óptima de la proteína codificada. El transgén puede diseñarse para dirigir la expresión de la proteína codificada de manera que facilite su recuperación del organismo o de un producto producido por el organismo, por ejemplo, de la leche, sangre, orina, huevos, pelo o semillas del organismo. El transgén puede consistir en secuencias de ácido nucleico derivadas del genoma de la misma especie o de una especie diferente a la especie del animal diana. El transgén puede integrarse en un locus de un genoma donde esa secuencia de ácido nucleico particular no se encuentra normalmente de otro modo o en el locus normal para el transgén.

La expresión "organismo transgénico de línea celular germinal" se refiere a un organismo transgénico en el que se introdujo la modificación genética o la información genética en una célula de línea germinal, lo que confiere así la capacidad del organismo transgénico para transferir la información genética a la descendencia. Si tal descendencia posee realmente alguna o toda esa modificación o información genética, entonces también son organismos

transgénicos. La modificación o información genética puede ser extraña para la especie del organismo al que pertenece el receptor, extraña sólo para el receptor individual particular, o puede ser información genética que ya posee el receptor. En el último caso, el gen introducido o modificado puede expresarse de forma diferente al gen nativo.

5 Un organismo transgénico puede ser un animal, una planta o un ser humano transgénico. Los transgénicos pueden producirse mediante una diversidad de procedimientos diferentes que incluyen la transfección, electroporación, microinyección, direccionamiento génico en células madre embrionarias e infección retroviral y viral recombinante (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N°: 4.736.866 y 5.602.307; Mullins *y col.*, (1993) *Hypertension* 22 (4):630-633; Brenin *y col.*, (1997) *Surg. Oncol.* 6(2)99-110; Tuan (ed.), *Recombinant Gene Expression Protocols, Methods in Molecular Biology* n° 62, Humana Press (1997)). El procedimiento de introducción de fragmentos de ácido nucleico en células de mamífero competentes para la recombinación puede ser mediante cualquier procedimiento que favorezca la co-transformación de moléculas de ácido nucleico múltiples. Los procedimientos detallados para producir animales transgénicos están fácilmente disponibles para un experto en la materia, incluyendo las descripciones en las patentes de Estados Unidos N° 5.489.743 y 5.602.307. En los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (págs. 151-162) se proporciona información adicional.

Terapia Génica

Las construcciones que codifican proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden utilizarse como parte de un protocolo de terapia génica para administrar dosis terapéuticamente eficaces de la proteína de fusión a albúmina. Una estrategia para la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula es usando un vector viral que contiene un ácido nucleico, que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células diana puede recibir el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas en el vector viral, por ejemplo, por un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficazmente en células que han captado el ácido nucleico del vector viral. La semivida plasmática prolongada de las proteínas de fusión a albúmina descritas podría incluso compensar un nivel de expresión potencialmente bajo. Pueden utilizarse vectores de retrovirus y vectores de virus adenoasociados como un sistema de administración de genes recombinantes para la transferencia de moléculas de ácido nucleico exógenas que codifican las proteínas de fusión a albúmina *in vivo*. Estos vectores proporcionan una administración eficaz de los ácidos nucleicos en las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de manera estable en el ADN cromosómico del huésped. Ejemplos de tales vectores, procedimientos para su uso, y sus ventajas, así como procedimientos de administración no virales se describen con detalle en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (págs. 151-153).

En un paciente pueden introducirse sistemas de administración de genes para un gen que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención mediante cualquiera de una serie de procedimientos. Por ejemplo, puede introducirse, de forma sistémica, una preparación farmacéutica del sistema de administración de genes, por ejemplo, por inyección intravenosa, y la transducción específica de la proteína en las células diana se produce predominantemente a partir de la especificidad de transfección proporcionada por el vehículo de administración de genes, la expresión del tisular o celular debida a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del gen receptor, o una combinación de las mismas. En otras realizaciones, la administración inicial del gen recombinante es más limitada al ser la introducción en el animal muy localizada. Por ejemplo, el vehículo de administración de genes puede introducirse mediante catéter (véase la patente de Estados Unidos 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (por ejemplo, Chen *y col.*, (1994) *PNAS* 91:3054-3057). La preparación farmacéutica de la construcción de terapia génica puede consistir básicamente en el sistema de administración de genes en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incorpora el vehículo de administración de genes. Cuando la proteína de fusión de albúmina puede producirse intacta a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células que producen la proteína de fusión a albúmina. Procedimientos de terapia génica adicionales se describen en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (págs. 153-162).

Composiciones farmacéuticas o terapéuticas

Las proteínas de fusión a albúmina de la invención o formulaciones de las mismas pueden administrarse mediante cualquier procedimiento convencional que incluye la inyección parenteral (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o la infusión intravenosa. El tratamiento puede consistir en una dosis única o en una pluralidad de dosis durante un período de tiempo. Además, la dosis, o la pluralidad de dosis, se administran con menor frecuencia que para la proteína terapéutica que no está fusionada a la albúmina.

Aunque es posible administrar en solitario una proteína de fusión de albúmina de la invención, es deseable presentarla como una formulación farmacéutica, junto con uno o más vehículos aceptables. El vehículo (o vehículos) debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la proteína de fusión de albúmina y no perjudicial para los receptores de la misma. Típicamente, los vehículos serán agua o solución salina que serán estériles y apirógenos. Las proteínas de fusión a albúmina de la invención están particularmente adecuadas para la formulación en vehículos acuosos tales como agua, solución salina u otras soluciones isotónicas estériles aprógenas debido a su vida útil prolongada en solución. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse bien con antelación en forma acuosa, por ejemplo, semanas o meses o períodos de tiempo más largos antes de

dispensarse.

5 Las formulaciones que contienen la proteína de fusión de albúmina pueden prepararse teniendo en cuenta la vida útil prolongada de la proteína de fusión de albúmina en formulaciones acuosas. Como se ha analizado anteriormente, la vida útil de muchas de estas proteínas terapéuticas se ve notablemente aumentada o prolongada después de la fusión a la AH.

10 En los casos en que resulte apropiada la administración en aerosol, las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden formularse en forma de aerosoles utilizando procedimientos convencionales. El término "aerosol" incluye cualquier fase en suspensión transportada por un gas de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención que pueda inhalarse al interior de los bronquiolos o conductos nasales. Específicamente, el aerosol incluye una suspensión de gotitas transportadas por un gas de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, como puede producirse en un inhalador, nebulizador, o atomizador de dosis medida, El aerosol también incluye una composición de polvo seco de un compuesto de la presente invención suspendido en aire o en otro gas transportador, que puede administrarse por insuflación, por ejemplo, desde un dispositivo inhalador.

15 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica farmacéutica. Tales procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación la proteína de fusión de albúmina con el vehículo que constituye uno o más principios accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con los vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuese necesario, conformar el producto.

20 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación apropiada para el receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes monodosis o de multidosis, por ejemplo jeringas, viales o ampollas selladas, y pueden conservarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las suspensiones y soluciones para inyección improvisada pueden prepararse a partir de polvos estériles. Las formulaciones de dosificación puede contener la parte de proteína terapéutica a una concentración molar inferior o en una menor dosificación en comparación con la formulación convencional no fusionada para la proteína terapéutica dada la prolongación de la semivida que presentan muchas de las proteínas de fusión a albúmina de la invención.

25 A modo de ejemplo, cuando una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende una o más de las regiones de proteína terapéutica, la forma de dosificación puede calcularse en base a la fuerza relativa de la proteína de fusión de albúmina respecto a la fuerza de la proteína terapéutica, teniendo en cuenta la vida útil y la semivida en suero prolongada de las proteínas de fusión a albúmina en comparación con la de la proteína terapéutica nativa. Por ejemplo, en una proteína de fusión de albúmina que consiste en una AH de longitud completa fusionada a una proteína terapéutica de longitud completa, una dosis equivalente en términos de unidades representaría un mayor peso de agente pero puede reducirse la frecuencia de dosificación.

30 Las formulaciones o composiciones de la invención pueden envasarse junto con, o incluirse en un kit con, instrucciones o prospectos referentes a la vida útil prolongada del componente de proteína de fusión a albúmina. Por ejemplo, tales instrucciones o prospectos pueden considerar condiciones de almacenamiento recomendadas, tales como tiempo, temperatura y luz, teniendo en cuenta la vida útil alargada o prolongada de las proteínas de fusión a albúmina de la invención. Tales instrucciones o prospectos también pueden considerar las ventajas particulares de las proteínas de fusión a albúmina de la invención, tales como la facilidad de almacenamiento de las formulaciones que pueden requerir su uso en el campo, fuera de las condiciones controladas en el hospital, clínica o consultorio médico. Como se ha descrito anteriormente, las formulaciones de la invención pueden estar en forma acuosa y pueden almacenarse en condiciones subóptimas sin pérdida significativa de actividad terapéutica.

35 La invención también proporciona procedimientos de tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos (tales como, por ejemplo, una cualquiera o más de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento) administrando a un sujeto, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, una cantidad eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención o un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención ("polinucleótido de fusión a albúmina").

40 Las dosis eficaces del polinucleótido y/o de la proteína de fusión de albúmina de la invención a administrar pueden determinarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia que abordan parámetros tales como la semivida, biodisponibilidad y toxicidad biológica que incluyen el uso de datos de estudios rutinarios realizados *in vivo* e *in vitro*, utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia.

45 El polinucleótido y/o la proteína de fusión de albúmina se formulará y se dosificará de una manera coherente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado clínico del propio paciente (especialmente los efectos secundarios del tratamiento con el polinucleótido y/o la proteína de fusión de albúmina en solitario), el sitio de

administración, el procedimiento de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos. Por tanto, la "cantidad eficaz" para los fines en el presente documento viene determinada por tales factores.

5 Por ejemplo, la determinación de una cantidad eficaz de sustancia a administrar puede depender de una serie de factores que incluye, por ejemplo, la estructura química y la actividad biológica de la sustancia, la edad y el peso del paciente, la afección concreta que requiere tratamiento y su gravedad, y la vía de administración. La frecuencia de los tratamientos depende de una serie de factores, tales como la cantidad de construcciones de polinucleótidos o proteína de fusión de albúmina administrada por dosis, así como de la salud y del historial médico del sujeto. Los tiempos de administración, número de dosis y la cantidad exacta vendrán determinados por el médico o veterinario tratante.

Los polinucleótidos y las proteínas de fusión a albúmina de la presente invención pueden administrarse a cualquier animal, preferentemente a mamíferos y a aves. Los mamíferos preferentes incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, conejos, ovejas, ganado bovino, caballos y cerdos, prefiriéndose particularmente los seres humanos.

15 Como propuesta general, la proteína de fusión de albúmina de la invención se dosificará por debajo de (en base a la molaridad de la proteína terapéutica no fusionada) o se administrará con menos frecuencia que la proteína terapéutica no fusionada. Las proteínas de fusión a albúmina de la invención resultan ventajosas ya que pueden simular la infusión continua de "fármacos clásicos", es decir, para una misma actividad inhibidora se necesita menos equivalente de proteína.

20 Los polinucleótidos y/o las proteínas de fusión a albúmina pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, geles, gotas o parche transdérmico), bucal, o como un pulverizador oral o nasal. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, material de encapsulación, material de relleno sólido, semisólido o líquido no tóxico, o auxiliar de formulación de cualquiera. El término "parenteral" tal y como se utiliza en el presente documento se refiere a los modos de administración que incluyen la infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, 25 intraesternal, subcutánea e intraarticular.

Los polinucleótidos y/o las proteínas de fusión a albúmina de la invención también se administran adecuadamente mediante sistemas de liberación controlada tales como los descritos en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (págs. 129-130).

30 Para la administración parenteral, en una realización, el polinucleótido y/o la proteína de fusión de albúmina se formula en general mezclándolo al grado de pureza deseado, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no sea tóxico a los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y que sea compatible con otros principios de la formulación. Por ejemplo, la formulación no incluye opcionalmente agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para la terapéutica.

35 Los polinucleótidos y/o las proteínas de fusión a albúmina de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los agentes polinucleótidos y/o la proteína de fusión de albúmina que pueden administrarse en combinación con los polinucleótidos y/o las proteínas de fusión a albúmina de la invención incluyen, pero si limitación, agentes antirretrovirales como inhibidores del ensamblaje, de la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa, agentes quimioterapéuticos, antibióticos, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes 40 inmunoterapéuticos convencionales y/o tratamientos terapéuticos como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 03/066824 y WO 01/79480 (págs. 132-151). Las combinaciones pueden administrarse ya sea de forma conjunta, por ejemplo, como una mezcla, por separado pero simultáneamente o al mismo tiempo; o secuencialmente. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como una mezcla terapéutica, y también procedimientos en los que los agentes combinados se administran por separado, pero 45 simultáneamente, por ejemplo, como a través de líneas intravenosas separadas en el mismo individuo. La administración "en combinación" incluye adicionalmente la administración por separado de uno de los compuestos o agentes proporcionado en primer lugar, seguido por el segundo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su propósito deseado. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos y/o las proteínas de fusión a albúmina de la invención se administran 50 en combinación con agentes antirretrovirales, inhibidores de nucleósidos/nucleótidos de la transcriptasa inversa (INTI), inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (INNTI), y/o inhibidores de la proteasa (IP).

La invención también proporciona un kit o envase farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con uno o más de los principios de las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión a albúmina 55 de la invención. Opcionalmente asociado con tal recipiente (o recipientes), puede haber una advertencia en cuanto a la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de los productos farmacéuticos o biológicos, una advertencia que refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos.

Habiendo descrito en general la invención, la misma se comprenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos.

5 Sin descripción adicional, se cree que un experto habitual en la materia puede, usando la anterior descripción y los siguientes ejemplos ilustrativos, realizar y utilizar las modificaciones detectadas en la presente invención y poner en práctica los procedimientos reivindicados. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo, señalan específicamente determinadas realizaciones de la presente invención, y no deben considerarse como limitativos en modo alguno del resto de la descripción.

Ejemplo 1: Preparación de IL-11 fusionada a albúmina

10 Los vectores de expresión de albúmina recombinante pAYE645 y pAYE646 se han descrito anteriormente en el documento WO 2004/009819. El plásmido pAYE645 que contiene la secuencia líder de fusión de SAH/MF α -1, así como el promotor *PRB1* de levadura y el terminador *ADH1* de levadura que proporcionaban el promotor de la transcripción y las secuencias terminadoras de la transcripción apropiadas, se describe en el documento WO 2004/009819. Con la enzima de restricción *AflI* se realizó la digestión completa del plásmido pAYE645 y se realizó la digestión parcial con la enzima de restricción *HindIII* y el fragmento de ADN que comprendía el extremo 3' del promotor *PRB1* de levadura y se aisló la secuencia codificante de la albúmina. Se realizó la digestión del plásmido pDB2241, descrito en la solicitud de patente WO 00/44772, con *AflI/HindIII* y el fragmento de ADN que comprendía el extremo 5' del promotor *PRB1* de levadura y se aisló el terminador *ADH1* de la levadura. A continuación, el fragmento de ADN de *AflI/HindIII* de pAYE645 se clonó en el fragmento de ADN del vector pDB2241 con *AflI/HindIII* para crear el plásmido pDB2302. Se realizó la digestión completa del plásmido pDB2302 con *PacI/XhoI* y el fragmento de 6,19 kb aislado, los extremos cohesivos se hicieron romos con la ADN polimerasa de T4 y los dNTP, y volvieron a ligarse para generar el plásmido pDB2465. El plásmido pDB2465 se linealizó con *Clal*, los extremos cohesivos se hicieron romos con ADN polimerasa de T4 y los dNTP, y volvieron a ligarse para generar el plásmido pDB2533. El plásmido pDB2533 se linealizó con *BlnI*, los extremos cohesivos se hicieron romos con ADN polimerasa de T4 y los dNTP y volvieron a ligarse para generar el plásmido pDB2534. Se realizó la digestión completa del plásmido pDB2534 con *BmgBI/BglII*, el fragmento de ADN de 6,96kb se aisló y se ligó a uno de dos oligonucleótidos engarzadores bicatenarios, VC053/VC054 y VC057/VC058 para crear el plásmido pDB2540, o VC055/VC056 y VC057/VC058 para crear el plásmido pDB2541.

VC053: 5'-GATCTTTGGATAAGAGAGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCT-CACCGGT-3' (SEC ID N°: 1)

VC054: 5'-pCCTTGAACCGGTGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCTCTCTTATCCAAA-3' (SEC ID N°: 2)

VC055: 5'-GATCTTTGGATAAGAGAGACGCTCACAAGTCCGAAGTCGCTCATCGAT-3' (SEC ID N°: 3)

VC056: 5'-pCCTTGAATCGATGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCTCTCTCTTATCCAAA-3' (SEC ID N°: 4)

VC057: 5'-pTCAAGGACCTAGGTGAGGAAAACCTCAAGGCTTTGGTCT-TGATCGCTTTGCTCAATACTTGCAACAATGTCCATTGGAAGATCAC-3' (SEC ID N°: 5)

VC058: 5'-GTGATCTTCGAATGGACATTGTTGCAAGTATTGAGCGAAAGCGA-TCAAGACCAAAGCCTTGAAGTTTTCTCACCTAGGT-3' (SEC ID N°: 6)

30 Se preparó una dilución en serie de una muestra de ADNc de IL-11 humana de 100 ng.ml⁻¹ a 10 pg.ml⁻¹ (en

incrementos de 10 veces). Los cebadores de PCR CF59 (SEC ID N°:7) y CF60 (SEC ID N°:12) se diseñaron para permitir la clonación del ADNc de IL-11 como una fusión a albúmina N-terminal en pDB2541 linealizado con *Bgl*II y *Cla*I, delecionando al tiempo el codón que codifica la prolina N-terminal de la región codificante de IL-11. La secuencia de ADN de cada cebador era de la siguiente manera:

CF59

*Bgl*II
HSA/MF α -1
líder de fusión
IL11

5'-CGATAGATCTTTGGATAAGAGAGGGGCCACCACCTGGCCCC-
CTCGAGTTTCCCC-3'

CF60

*Cla*I
albúmina
IL11

5'-GGCCATCGATGAGCGACTTCGGACTTGTGAGCGTCCAGCCGAGT-
CTTCAGCAGCAGCAGTCCCCTC-3'

- 5 Se preparó una mezcla maestra de la siguiente manera: tampón PCR MgCl₂ 2mM, 10 μ M de dNTP de PCR, 0,2 μ M de CF59, 0,2 μ M de CF60, 2U de *Taq* ADN polimerasa de FastStart. Se añadió 1 μ l del ADNc de IL-11 (10pg, 100pg, 1ng, 10ng 100ng) a 49 μ l de mezcla de reacción. El volumen total de reacción fue 50 μ l. Se programó un termociclador Perkin-Elmer 9600 de la siguiente manera: Desnaturalizar a 95 °C durante 4 minutos [HOLD], a continuación [CYCLE] desnaturalizar a 95 °C durante 30s, hibridar durante 30s a 45 °C, alargar hasta 72 °C durante 60s durante 20 ciclos, seguido de [HOLD] a 72 °C durante 600s, y a continuación [HOLD] a 4 °C. Los productos de la amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel y se observó una banda del tamaño esperado (0,59kb). Utilizando un kit Gene Clean III (BIO101 Inc.), se aisló el fragmento de ADN de 0,59kb del gel de agarosa en TAE al 1% (p/v).
- 10
- 15 Se realizó toda la digestión del fragmento de ADN de la PCR con las endonucleasas de restricción *Bgl*II/*Cla*I y con *Bgl*II/*Cla*I el fragmento de 0,58kb se ligó en el fragmento de ADN del vector pDB2541de 6,15kb para crear el plásmido pDB2567.

- 20 Las secuencias apropiadas de vector de levadura se proporcionaron por un plásmido de "disgregación" pSAC35 descrito en general en el documento EP-A-286 424 y descrito por Sleep, D., y col. (1991) Bio/Technology 9, 183-187. El casete de expresión de la (des-pro)IL11-albúmina N-terminal *Not*I de 3,53kb se aisló de pDB2567, se purificó y se ligó en pSAC35 digerido por *Not*I que había sido tratado con fosfatasa intestinal de ternero, creando el plásmido pDB2569 que contenía el casete de expresión *Not*I en la misma orientación que el marcador de selección *LEU2*, y el plásmido pDB2570 que contenía el casete de expresión *Not*I en la orientación opuesta al marcador de selección *LEU2*.

- 25 Se diseñaron los cebadores de PCR CF61 y CF62 para permitir la clonación del ADNc de IL-11 como una fusión a albúmina C-terminal en pDB2243 linealizado con *Bsu*36I y parcialmente digerido con *Hind*III, al tiempo que se añadían dos codones de terminación de la traducción "TAA" en el extremo 3' de la fase de lectura abierta de IL-11. El plásmido pDB2243, previamente descrito en la solicitud de patente WO 00/44772, que contenía el promotor *PRB1* de levadura y el terminador *ADH1* de levadura, proporcionó secuencias terminadoras y promotoras de la transcripción apropiadas. La secuencia de ADN de los cebadores CF61 (SEC ID N°:13) y CF62 (SEC ID N°:14) fue la siguiente:
- 30

CF61

*Bsu*36I
albúmina
IL11

5'-CCGGCCTTAGGCTTACCTGGGCCACCACCTGGCCCCCTCG-
AGTTTCCCC-3'

CF62

*Hind*III
IL11

5'-GGCAAAGCTTATTACAGCCGAGTCTTCAGCAGCAGCAGTCCCCTC-
3'

STOP STOP

Se preparó una mezcla maestra de la siguiente manera: tampón PCR MgCl₂ 2mM, 10 μ M de dNTP de PCR, 0,2 μ M

5 de CF61, 0,2µM de CF62, 2U de *Taq* ADN polimerasa de FastStart. Se añadió 1µl del ADNc de IL-11 (10pg, 100pg, 1ng, 10ng 100ng) a 49µl de mezcla de reacción. El volumen total de reacción fue de 50µl. Se programó un termociclador Perkin-Elmer 9600 de la siguiente manera: Desnaturalizar a 95 °C durante 4 minutos [HOLD], a continuación [CYCLE] desnaturalizar a 95 °C durante 30s, hibridar durante 30s a 45 °C, alargar hasta 72 °C durante 60s durante 20 ciclos, seguido de un [HOLD] a 72 °C durante 600s, y a continuación [HOLD] a 4 °C. Los productos de la amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en gel y se observó una banda del tamaño esperado (0,55kb). Utilizando un kit Gene Clean III (BIO101 Inc.), se aisló el fragmento de ADN de 0,59kb del gel de agarosa en TAE al 1% (p/v).

10 Se realizó la digestión completa del fragmento de ADN de la PCR con las endonucleasas de restricción *Bsu36I/HindIII* y el fragmento de 0,55kb se ligó por *Bsu36I* en pDB2243 de 6,19kb, parcialmente digerido con el fragmento de ADN vector *HindIII* para crear el plásmido pDB2568.

15 Las secuencias apropiadas del vector de levadura las proporcionó un plásmido de "disgregación" pSAC35 descrito en general en el documento EP-A-286 424 y descrito por Sleep, D., *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9, 183-187. El casete de expresión de IL-11 albúmina C-terminal *NotI* de 3,53kb se aisló de pDB2568, se purificó y se ligó en pSAC35 digerido por *NotI* que se había tratado con fosfatasa intestinal de ternero, creando el plásmido pDB2571 que contenía el casete de expresión *NotI* en la misma orientación que el marcador de selección *LEU2*, y el plásmido pDB2572 que contenía el casete de expresión *NotI* en la orientación opuesta al marcador de selección *LEU2*. Las cepas de levadura descritas en los documentos WO 95/23857, WO 95/33833 y WO 94/04687 se transformaron en prototofía para la leucina como se describe en Sleep D., *y col.* (2001) *Yeast* 18, 403-421. Los transformantes se parchearon en medio mínimo tamponado (MMT, descrito por Kerry-Williams, SM *y col.* (1998) *Yeast* 14, 161-169) y se incubaron a 30 °C hasta que crecieron lo suficiente para su posterior análisis.

20 La secuencia de ADN de la fase de lectura abierta de la fusión de IL-11 a albúmina N-terminal forma la SEC ID N°:15.

25 La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de IL11 a albúmina N-terminal se presenta como SEC ID N°:16.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de IL11 a albúmina N-terminal madura forma la SEC ID N°:17.

GPPPGPPRVSPDPRAELDSTVLLTRSLRADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDS
 LPTLAMSAGALGALQLPGVLTRLRADLLSYLRHVQWLRRAAGGSSSLKTLEPE
 LGTLQARLDRLRLRLQLLMSRLALPQPPDPPAPPLAPPSSAWGGIRAAHAI
 LGGLHLTLDWAVRGLLLKTRLDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFA
 QYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVA
 TLRETYGEMADCCAQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVREVDVMCTAFH
 DNEETFLKKYL YELARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLL
 PKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFA
 EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
 KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMF
 LYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPL
 VEPPQNLIKQNCLEFELGQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLG
 KVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESL
 VNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELV
 KHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADKETCFAEKGKLVAAASQAA
 LGL

La secuencia de ADN de la fase de lectura abierta de fusión de IL11 a albúmina C-terminal es la SEC ID N°:18.

30 Y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína de fusión de IL11 a albúmina C-terminal es la SEC ID N°:19.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de IL11 a albúmina C-terminal madura es la SEC ID N°:20.

Ejemplo 2: Purificación

Purificación de la IL-11 C-terminal

5 La fusión de la IL-11 C-terminal contenía altos niveles de material recortado (es decir, de longitud no completa). Se purificó utilizando las condiciones SP-FF rHA convencionales como se describe en el documento WO 00/44772, pero de un modo negativo de manera que la fusión se dio flujo a través. El flujo a través se ajustó a pH 8 y 2,5mS.cm⁻¹ y se cargó en un DE-FF Ahr convencional equilibrado en tetraborato potásico 15 mM. Esto se hizo funcionar en un modo negativo. La conductividad del flujo a través DE-FF se aumentó a 15mS.cm⁻¹ y el material se purificó utilizando cromatografía DBA Ahr convencional con una elución adicional de octanoato 50mM en el tampón de equilibrio. A continuación el material se concentró y se diafiltró contra glicina 300mM, fosfato 10mM a pH 7.

Purificación de la IL-11 N-terminal (tipo A)

15 La IL-11 N-terminal contenía algo de material recortado. Se purificó utilizando las condiciones SP-FF rHA convencionales como se describe en el documento WO 00/44772. La mayoría estaba en el flujo a través pero lo suficientemente unida para resultar necesario eluirla utilizando el tampón de elución convencional que contiene NaCl 200mM. El eluato se ajustó a pH 8 y 2,5mS.cm⁻¹ y se purificó utilizando el DE-FF rHA convencional equilibrado en tetraborato potásico 15mM. El DE-FF se eluyó utilizando el tampón de elución rHA convencional. A continuación, el material purificado se concentró y se diafiltró contra glicina 300mM, fosfato 10mM a pH 7.

Purificación de la IL-11 N-terminal (tipo B)

20 La proteína de fusión IL-11 N-terminal contenía algo de material recortado. Este material se separó utilizando una columna S-Sepharose-FF de acuerdo con las condiciones SP-FF rHA convencionales. La rHA libre permaneció en la columna. Entonces la proteína de fusión en el flujo a través se absorbió a un Sepharose anticuerpo monoclonal específico para la albúmina. La columna se lavó con alto contenido de sal y se eluyó a pH 2,5. El eluato se ajustó a pH neutro, se concentró y se diafiltró contra glicina 300mM, fosfato de sodio 10mM a pH 7,0.

Caracterización de proteínas después de la purificación

25 **Tabla 1: IL-11 caracterización de fusión de IL11-albúmina**

	Fusión C-terminal	Fusión N-terminal (tipo A)	Fusión N-terminal (Tipo B)
% de pureza por SDS-PAGE y tinción con azul coloidal	77	90	89
indicación ESMS de modificaciones traduccionales post-	Masa teórica 85565. Masa medida 68000-70000	Masa teórica 85468 Masa medida 85471. Buena evidencia de una estructura primaria correcta.	Masa teórica 85468. Masa medida 85471. Buena evidencia de una estructura primaria correcta.
Secuencia N-terminal	N/D	Secuencia NT correcta para IL-11.	
Endotoxina (EU.ml ⁻¹)	73	23	130
Concentración de Fusión (mg.ml ⁻¹)	1,5	2,7	1

Las imágenes del gel no reductor de SDS en gradiente al 12% y las transferencias de Western se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 3: Farmacocinética de la IL-11 fusionada con albúmina frente a la IL-11 humana recombinante después de una única administración intravenosa o subcutánea a conejos

30 Tres conejos macho y tres hembra por grupo recibieron IL-11 Neumega[®] (100µg/kg) o IL-11 fusionada con albúmina C-terminal (440µg/kg) mediante una única inyección intravenosa o subcutánea en el día 0 (Tabla 2). Se tomaron muestras de sangre para la determinación de los niveles de antígeno respectivos al inicio del estudio y a los 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h (1 d), 48 h (2 d), 72 h (3 días), 5 d, 7 d, 9 d, 11 d y 14 días después de administración intravenosa de la sustancia de ensayo respectiva y al inicio del estudio, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h (1 d), 48 h (2 d), 72 h (3 días), 5 d, 7 d, 9 d, 11 d y 14 días después de la inyección subcutánea. Las

dosis de IL-11 Neumega® e IL-11 fusionada con albúmina C-terminal se calcularon sobre una base equimolar.

Medición de los niveles plasmáticos de IL-11

5 Los niveles plasmáticos de la IL-11 humana se midieron mediante el kit Quantikine® Human IL-11 Immunoassay (R & D Systems, Catálogo N ° D1100). Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo de tipo sándwich. Un anticuerpo monoclonal murino específico para la IL-11 se había recubierto sobre una microplaca. Los patrones y las muestras se pipetearon en los pocillos y cualquier IL-11 presente se une por el anticuerpo inmovilizado. Después de lavar cualquier sustancia no unida, se añade a los pocillos un anticuerpo policlonal unido a enzimas específico para la IL-11. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo enzimático no unido a anticuerpos, se añade a los pocillos una solución de sustrato y se revela el color en proporción a la cantidad de IL-11 unida en la etapa inicial. Se detiene el revelado del color y se mide la intensidad del color.

Semivida plasmática de proteína fusionada frente a proteína no fusionada en conejos.

Las desviaciones medias y típicas de las concentraciones de IL-11 en cada instante de tiempo se muestran en la Figura 1 para los grupos tratados por vía intravenosa y en la Figura 2 para los grupos tratados por vía subcutánea.

15 En los animales tratados por vía intravenosa, pueden encontrarse niveles superiores a 100pg/ml para un día después de la inyección en el grupo IL-11 Neumega® y durante 9 días después de la inyección en el grupo IL-11 fusionada con albúmina.

20 En los animales tratados por vía subcutánea, los niveles de IL-11 Neumega® alcanzan su punto máximo alrededor de las 6 horas después de la inyección y se mantienen por encima de 100pg/ml durante poco menos de 2 días (Figura 2). Los niveles del grupo IL-11 fusionada con albúmina alcanzan su punto máximo 24 horas después la inyección y se mantienen por encima de 100pg/ml durante algo menos de 7 días. Los resultados farmacocinéticos se presentan en la Tabla 2 para los grupos tratados por vía intravenosa y en la Tabla 3 para los grupos tratados por vía subcutánea.

Tabla 2: Resultados farmacocinéticos tras la administración por vía intravenosa

		IL-11 Neumega®	IL-11 fusionada con albúmina C-terminal
	N	6	6
Semivida inicial (h)	Media	0,12	3,61
	Desviación típica	0,03	2,53
	Mediana	0,11	3,32
	Intervalo	0,09 - 0,15	0,30 - 6,52
Semivida terminal (h)	Media	3,31	22,79
	Desviación típica	2,30	8,07
	Mediana	2,12	22,08
	Intervalo	1,59 - 7,01	14,73 - 35,93
ABC₀₋₁₄ (h·pg/ml)	Media	162.686	5.421.764
	Desviación típica	60.920	513.997
	Mediana	156.014	5.552.217
	Intervalo	99.915 - 23.2051	4.719.147 - 5.946.916
	Media Geométrica	152.862	5.397.976
	Factor de dispersión *	1,47	1,10

(continuación)

		IL-11 Neumega®	IL-11 fusionada con albúmina C-terminal
	N	6	6
C_{max} (pg/ml)	Media	547.425	395.308
	Desviación típica	194.193	61.216
	Mediana	540.825	379.975
	Intervalo	274.200 - 760.450	332.300 - 489.100
Eliminación total (ml/h/kg)	Media	721	21,0
	Desviación típica	335	3,1
	Mediana	662	19,5
	Intervalo	382 – 1.123	18,5 - 19,5
Volumen total de distribución (ml/kg)	Media	771	537
	Desviación típica	636	170
	Mediana	628	500
	Intervalo	204 – 1.781	377 - 847
Tiempo medio de residencia (h)	Media	0,94	25.1
	Desviación típica	0,49	4.3
	Mediana	0,81	25,2
	Intervalo	0,44 - 1,63	20,4 - 31,9

* factor de dispersión = exp [desviación típica (valores transformados logarítmicamente)]

Tabla 3: Resultados farmacocinéticos tras la administración por vía subcutánea

		IL-11 Neumega®	IL-11 fusionada con albúmina C-terminal
	N	6	6
Semivida de absorción (h)	Media	1,14	16,5
	Desviación típica	0,76	8,5
	Mediana	0,81	15,0
	Intervalo	0,35 - 2,12	7,7 - 32,5
Semivida terminal (h)	Media	4,67	18,0
	Desviación típica	1,43	3,9
	Mediana	4,40	19,2
	Intervalo	3,07 - 6,67	11,7 - 22,3

(continuación)

		IL-11 Neumega [®]	IL-11 fusionada con albúmina C-terminal
	N	6	6
ABC₀₋₁₄ (h·pg/ml)	Media	122.093	1.794.152
	Desviación típica	28.159	753.505
	Mediana	118.860	1.665.227
	Intervalo	95.376 - 172.688	1.113.203 - 3.000.848
	Media Geométrica	119.635	1.670.725
	Factor de dispersión *	1,24	1,51
C_{max} (pg/ml)	Media	8.098	30.590
	Desviación típica	2.468	9.091
	Mediana	8.061	29.420
	Intervalo	5.342 - 11.117	21.261 - 44.730
t_{max} (h)	Media	5,67	28,0
	Desviación típica	2,66	9,80
	Mediana	6,00	24,0
	Intervalo	2,00 - 8,00	24,0 - 48,0
Eliminación total relativa (ml/h/kg)	Media	1.270	70,9
	Desviación típica	407	27,5
	Mediana	1.286	69,9
	Intervalo	639 - 1.842	38,3 – 102,3
Volumen total relativo de distribución (ml/kg)	Media	8.880	1753
	Desviación típica	4.969	532
	Mediana	6.910	1.599
	Intervalo	4.512 – 15.836	1.041 – 2.495

* factor de dispersión = exp [desviación típica (valores transformados logarítmicamente)]

Administración subcutánea frente a intravenosa en conejos

5 La IL-11 fusionada con albúmina C-terminal mostró una semivida de eliminación media que fue 8 veces mayor que la de IL-11 Neumega[®] tras la aplicación intravenosa (Tabla 4). El área bajo la curva fue 35 veces mayor. Después de la inyección subcutánea, la semivida de eliminación media de IL-11 fusionada con albúmina C-terminal fue 4 veces mayor que la de IL-11 Neumega[®]. El área bajo la curva fue 14 veces mayor.

Tabla 4: Comparación de la biodisponibilidad entre sustancias

Vía	Parámetro	Semivida de eliminación	ABC ₀₋₁₄	C _{max}
Intravenosa	Relación estimada (IL-11 fusionada con albúmina C-terminal/ IL-11 Neumega [®])	7,85	35,3	0,76
	Límites de confianza al 90%	5,24 - 11,76	25,9 - 48,2	0,56 - 1,03
Subcutánea	Relación estimada (IL-11 fusionada con albúmina C-terminal/ IL-11 Neumega [®])	3,93	14,0	3,80
	Límites de confianza al 90%	2,62 - 5,89	10,2 - 19,1	2,79 - 5,17

La biodisponibilidad de la Neumega[®] subcutánea frente a la intravenosa fue del 78% (Tabla 5), mientras que para la fusión de albúmina C-terminal se calculó como el 31%.

5

Tabla 5: Comparación de la biodisponibilidad entre vías de aplicación

Sustancia	Parámetro	Semivida de eliminación	de ABC ₀₋₁₄	C _{max}
IL-11 Neumega[®]	Relación estimada (subcutánea/intravenosa)	1,63	0,78	0,015
	Límites de confianza al 90%	1,09 - 2,44	0,57 - 1,07	0,011 - 0,021
IL-11 fusionada con albúmina C-terminal	Relación estimada (subcutánea/intravenosa)	0,81	0,31	0,075
	Límites de confianza al 90%	0,54 - 1,22	0,23 - 0,42	0,055 - 0,103

Ejemplo 4: Farmacocinética de IL-11 fusionada con albúmina frente a IL-11 recombinante humana tras la administración intravenosa o subcutánea a ratas.

10 Tres ratas por grupo recibieron IL-11 Neumega[®] (100µg/ml) o IL-11 fusionada con albúmina N-terminal (Tipo A) (440µg/ml) mediante una única inyección intravenosa o subcutánea en el día 0 (Tabla 6). Las muestras de sangre para la determinación de los niveles de antígeno respectivos se tomaron en los instantes de tiempo siguientes: preinyección, 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2h, 8h, 24h, 48h, 72h (3d), 5d, 7d. Las dosis de IL-11 Neumega[®] e IL-11 fusionada con albúmina N-terminal se calcularon sobre una base equimolar.

Diseño del estudio

15 Medición los niveles plasmáticos de IL-11

Los niveles plasmáticos de los grupos 1 y 3 (IL-11 Neumega[®]) se midieron con un ELISA anti-humano mediante un kit Quantikine[®] Human IL-11 Immunoassay (R&D Systems, Catálogo N °D1100), como se describe en el Ejemplo 3 anteriormente indicado. Los niveles plasmáticos de los grupos 2 y 4 (IL-11-AFP) se determinaron con un ELISA anti-albúmina humana. El patrón para este ensayo fue IL-11-AFP.

20 Semivida plasmática de la proteína fusionada frente a no fusionada en ratas.

25 En los animales tratados por vía intravenosa (Figura 3), se encontraron niveles superiores a 0,1ng/ml durante 6 a 12 horas después de la inyección en el grupo Neumega[®] y durante 3 días después de la inyección en el grupo IL-11 fusionada con albúmina. En los animales tratados por vía subcutánea (Figura 4), los niveles del grupo IL-11 Neumega[®] alcanzaron su punto máximo dentro de la 1ª hora después de la inyección y se mantuvieron por encima de 0,1ng/ml durante aproximadamente 9 horas. Los niveles en el grupo IL-11 fusionada con albúmina alcanzaron su

punto máximo entre las 2 y las 8 horas después de la inyección y se mantuvieron por encima de 0,1ng/ml durante al menos 44 horas.

Los resultados farmacocinéticos se presentan en la Tabla 6 para los grupos tratados por vía intravenosa y en la Tabla 7 para los grupos tratados por vía subcutánea.

5

Tabla 6: Resultados farmacocinéticos tras la administración por vía intravenosa

		IL-11 Neumega [®]	IL-11 fusionada con albúmina N-terminal
N		3	3
Semivida inicial (h)	Media	0,13	3,15
	Desviación típica	0,09	2,45
	Mediana	0,09	3,09
	Intervalo	0,07 - 0,24	0,73 - 5,62
Semivida terminal (h)	Media	1,39	28,08
	Desviación típica	0,92	23,10
	Mediana	0,92	24,57
	Intervalo	0,80 - 2,46	6,93 - 52,73
ABC (h·pg/ml)	Media	26.375	8.357.724
	Desviación típica	4.595	1.214.981
	Mediana	25.108	8.164.280
	Intervalo	22.548 - 31.471	7.251.070 - 9.657.822
	Media Geométrica	26.118	8.299.777
	Factor de dispersión *	1,19	1,15
C_{max} (pg/ml)**	Media	33.510	1.065.644
	Desviación típica	4.310	133.261
	Mediana	31.565	1.134.432
	Intervalo	30.51 - 38.450	912.045 - 1.150.455
Eliminación total (ml/h/kg)	Media	4.324	14.1
	Desviación típica	570	2.2
	Mediana	4.253	15.1
	Intervalo	3.793 - 4.926	11.6 - 15.7
Volumen total de distribución (ml/kg)	Media	3.281	157
	Desviación típica	538	27
	Mediana	2.971	150
	Intervalo	2.970 - 3.902	134 - 187

(continuación)

		IL-11 Neumega [®]	IL-11 fusionada con albúmina N-terminal
	N	3	3
Tiempo medio de residencia (h)	Media	0,78	11,2
	Desviación típica	0,22	2,1
	Mediana	0,70	11,9
	Intervalo	0,60 - 1,03	8,9 - 12,9

* factor de dispersión = \exp [desviación típica (valores transformados logarítmicamente)]

** medido a los 10 minutos, la medición postinyección más temprana en el estudio PSR 04/02

Tabla 7: Resultados farmacocinéticos tras la administración por vía subcutánea

		IL-11 Neumega [®]	IL-11 fusionada con albúmina N-terminal
	N	3	3
Semivida de absorción (h)	Media	0,74	2,63
	Desviación típica	0,19	1,97
	Mediana	0,85	3,24
	Intervalo	0,52 - 0,85	0,42 - 4,22
Semivida terminal (h)	Media	0,87	6,70
	Desviación típica	0,04	4,84
	Mediana	0,86	4,66
	Intervalo	0,85 - 0,92	3,21 - 12,23
ABC₀₋₁₄ (h·pg/ml)	Media	24.687	1.032.955
	Desviación típica	2.547	335.512
	Mediana	25.706	1.043.068
	Intervalo	21.788 - 26.566	692.500 - 1.363.295
	Media Geométrica	24.596	994.888
	Factor de dispersión *	de 1,11	1,41
C_{max} (pg/ml)	Media	7.550	63.636
	Desviación típica	135	14.205
	Mediana	7.612	62.159
	Intervalo	7.395 - 7.642	50.227 - 78.523

(continuación)

		IL-11 Neumega®	IL-11 fusionada con albúmina N-terminal
N		3	3
t_{max} (h)	Media	1,0	6,0
	Desviación típica	0,0	3,5
	Mediana	1,0	8,0
	Intervalo	1,0 - 1,0	2,0 - 8,0
Eliminación total relativa (ml/h/kg)	Media	4.168	112,0
	Desviación típica	480	47,5
	Mediana	3.962	87,9
	Intervalo	3.826 - 4.718	81,3 – 166,6
Volumen total relativo de distribución (ml/kg)	Media	5.275	956
	Desviación típica	842	527
	Mediana	4.858	771
	Intervalo	4.723 - 6.244	547 - 1.550

* factor de dispersión = exp [desviación típica (valores transformados logarítmicamente)]

Las concentraciones máximas de IL-11 medidas en el Estudio PSR 1/03 se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Valores máximos obtenidos dentro de la primera hora post-inyección

		IL-11 Neumega®	IL-11 fusionada con albúmina N-terminal
N		3	3
C_{max} intravenosa (pg/ml)	Media	910.200	1.537.879
	Desviación típica	30.524	109.122
	Mediana	911.600	1.581.818
	Intervalo	879.000 - 940.000	1.413.636 - 1.618.182
C_{max} subcutánea (pg/ml)	Media	7.086	0
	Desviación típica	618	0
	Mediana	7.133	0
	Intervalo	6.445 - 7.679	0 - 0
t_{max} (horas)	Media	0,42	-
	Desviación típica	0,29	-
	Mediana	0,25	-
	Intervalo	0,25 - 0,75	0,25 - 1,00

Administración subcutánea frente a intravenosa en ratas

La Tabla 9 muestra los resultados de los análisis de varianza con respecto a la biodisponibilidad relativa. Las diferencias entre los dos productos resultaron significativas con respecto a la semivida de eliminación, ABC y C_{max} para ambas vías de aplicación.

5 **Tabla 9: Comparación de la biodisponibilidad entre sustancias**

Vía	Semivida del parámetro	Eliminación	ABC	C_{max}
Intravenosa	Relación estimada (IL-11 fusionada con albúmina N-terminal/ Neumega®)	17,03	317,8	1,69
	Límites de confianza al 90%	5,98 - 48,49	230,8 - 437,5	- 1,41 - 2,02
Subcutánea	Relación estimada (IL-11 fusionada con albúmina N-terminal/ Neumega®)	6,50	40,5	8,29
	Límites de confianza al 90%	2,28 - 18,50	29,4 - 55,7	6,92 - 9,93

10 La Tabla 10 muestra los resultados de los análisis de varianza con respecto a la biodisponibilidad absoluta. Para IL-11 Neumega®, las diferencias entre las dos vías de aplicación no fueron estadísticamente significativas con respecto a la semivida de eliminación y el ABC. La diferencia en C_{max} fue altamente significativa. Para la IL-11 fusionada con albúmina, las diferencias entre las dos vías de aplicación no fueron significativas con respecto a semivida de eliminación. Las diferencias con respecto al ABC y C_{max} fueron altamente significativas.

Tabla 10: Comparación de la biodisponibilidad entre vías de aplicación

Sustancia	Parámetro	Semivida de eliminación	de ABC	C_{max}^a
IL-11 Neumega®	Relación estimada (subcutánea/intravenosa)	0,72	0,942	0,008
	Límites de confianza al 90%	0,25 - 2,04	0,684 - 1,296	0,007 - 0,010
IL-11 fusionada con albúmina N-terminal	Relación estimada (subcutánea/intravenosa)	0,27	0,120	0,041
	Límites de confianza al 90%	0,10 - 0,78	0,087 - 0,165	0,034 - 0,049

^a C_{max} valores de la vía intravenosa tomados del Estudio PSR 01/03, medidos 2 minutos postinyección

15 En ratas la IL-11 fusionada con albúmina N-terminal mostró una semivida de eliminación media que era 17 veces mayor que la de IL-11 Neumega® tras la aplicación intravenosa. El área bajo la curva fue 318 veces mayor. Después de la inyección subcutánea, la semivida de eliminación media de la IL-11 fusionada con albúmina N-terminal fue 6 veces mayor que la de IL-11 Neumega®. El área bajo la curva fue 40 veces mayor.

Ejemplo 5: Estimulación de la trombocitopoyesis en ratas sin tratamiento previo por la IL-11-proteína de fusión

Se trataron ratas CD sin tratamiento previo (10 por grupo) con IL-11 Neumega®, IL-11 fusionada C-terminal o N-terminal (tipo B), o placebo de acuerdo con el siguiente programa.

20

Tabla 11: Programa de tratamiento

Grupo	Sustancia	Dosis	Program. Apl.	Vol.	N
1	Solución de formulación	-	t= d 0 - d 9 s.c.	0.5 ml	10
2	IL-11 Neumega®	100 µg /kg	t= d 0 - d 9 s.c.	0.5 ml	10
3	IL-11-AFP C-term	660 µg /kg	t= d 0, d 3, d 6, d 9 s.c.	0.5 ml	10
4	IL-11-AFP N-term	660 µg /kg	t= d 0, d 3, d 6, d 9 s.c.	0.5 ml	10
5	IL-11-AFP C-term	660 µg /kg	t= d 0 - d 9 s.c.	0.5 ml	10
6	IL-11-AFP N-term	660 µg /kg	t= d 0 - d 9 s.c.	0.5 ml	10

5 Se tomaron muestras de sangre al inicio del estudio, el día 5, día 7, día 9, día 13 y día 16 y se midieron los parámetros hematológicos (PLT, WBC, RBC, HCT, HGB) y el peso corporal. La dosis de la proteína de fusión se calculó sobre una base equimolar en comparación con IL-11 Neumega® y se corrigió por un factor de 1,5 debido a los resultados de SDS-PAGE.

Resultados

10 Los recuentos de plaquetas máximos se alcanzaron en todos los grupos el día 7 (Figura 5). Los niveles medios mayores de $1528 \times 10^3/\mu\text{l}$ se lograron con la fusión N-terminal administrada diariamente (grupo 6) o cada tres días (grupo 4) con $1304 \times 10^3/\mu\text{l}$. La fusión C-terminal también mostró un efecto relacionado entre dosis e intervalo con unos niveles medios máximos de $1238 \times 10^3/\mu\text{l}$ al administrarse diariamente en comparación con $977 \times 10^3/\mu\text{l}$ si se administraba cada tres días. IL-11 Neumega® alcanzó los niveles máximos de $1032 \times 10^3/\mu\text{l}$ mientras que los animales de control se mantuvieron en $864 \times 10^3/\mu\text{l}$.

15 Los parámetros en sangre arterial (RBC, HGB, HCT) se mantuvieron constantes para todos los grupos. Los recuentos de glóbulos blancos mostraron un ligero aumento inicial seguido de una fluctuación no constante. Esto probablemente puede atribuirse al microtrauma causado por la extracción de muestras de sangre e inyecciones frecuentes. Todos los animales mostraron un ligero aumento de peso corporal normal a lo largo del período de observación.

20 En resumen, tanto la fusión N- y C-terminal administrada diariamente así como la fusión N-terminal administrada en intervalos de 3 días resultaron claramente superiores al control y la IL-11 Neumega® en los días 5, 7 y 9. Sin embargo, la fusión N-terminal parece alcanzar niveles más altos que la fusión C-terminal.

La disminución de los recuentos de plaquetas después de 7 días a pesar de la continuación del tratamiento hasta el día 9 podría ocurrir debido al desarrollo de anticuerpos neutralizantes de la proteína humana heteróloga.

Ejemplo 6: Tratamiento de la trombocitopenia inducida por quimioterapia en ratas mediante IL-11-proteína de fusión

25 Diez ratas CD hembra por grupo recibieron Carboplatino a 35mg/kg por vía intravenosa en el día 0. A partir del día 5 fueron tratadas con IL-11 Neumega®, IL-11 fusionada C-terminal o N-terminal (tipo B), o placebo de acuerdo con el siguiente programa.

Tabla 12: Programa de tratamiento

Grupo	Sustancia	Dosis	Program. Apl.	Vol.	N
1	Solución de formulación	-	t= d 5 - d 14 s.c.	0.5 ml	10
2	Neumega®	50 µg /kg	t= d 5 - d 14 s.c.	0.5 ml	10
3	IL-11-AFP C-term	330 µg /kg	t= d 5, d 8, d 11, d 14 s.c.	0.5 ml	10
4	IL-11-AFP N-term	330 µg /kg	t= d 5, d 8, d 11, d 14 s.c.	0.5 ml	10
5	IL-11-AFP C-term	330 µg /kg	t= d 5 - d 14 s.c.	0.5 ml	10
6	IL-11-AFP N-term	330 µg /kg	t= d 5 - d 14 s.c.	0.5 ml	10

30 Se tomaron muestras de sangre al inicio del estudio, el día 5, día 7, día 9, día 13 y día 16 y se midieron los parámetros hematológicos (PLT, WBC, RBC, HCT, HGB) y el peso corporal. La dosis de la proteína de fusión se

calculó sobre una base equimolar en comparación con IL-11 Neumega® y se corrigió por un factor de 1,5 debido a los resultados de SDS-PAGE.

Resultados

5 En todos los grupos se observaron nadires de plaquetas entre los días 5 y 9 (Tabla 13). Posteriormente los niveles de plaquetas se recuperaron por encima del valor basal en el día 16. La media de los niveles de plaquetas se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 13: Niveles medios de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Día 0	782	783	788	703	813	810
Día 5	477	281	368	458	344	365
Día 7	388	302	303	330	348	374
Día 9	365	323	365	375	328	432
Día 13	603	702	681	832	689	1064
Día 16	1003	1034	969	974	901	1287

10 Para IL-11 Neumega®, la fusión C- y N-terminal inyectada diariamente, el nadir de plaquetas se observó en el día 5, el primer día de tratamiento (Figura 6). Posteriormente en el grupo que recibió la fusión N-terminal diariamente los niveles de plaquetas aumentaron de forma constante y significativa, mientras que la fusión C-terminal administrada diariamente indujo un aumento comparable a IL-11 Neumega®.

15 Un análisis de covarianza ajustado para el valor de plaquetas del día 5 muestra un recuento de plaquetas significativamente mayor para la fusión N-terminal inyectada diariamente en comparación con el control en los días 9, 13 y 16, así como una superioridad significativa sobre IL-11 Neumega® el día 13. El mismo análisis demuestra un efecto global del tratamiento con $p \leq 0,004$ en los días 7, 13 y 16.

20 Teniendo en cuenta la duración de los niveles de plaquetas por debajo de $500 \times 10^3/\mu\text{l}$ nuevamente la fusión N-terminal muestra los mejores efectos a una media de 5,87 días cuando se inyectan a diario o 6,27 cada 3 días en comparación con 8,08 días para IL-11 Neumega® y 6,93 días para los controles. La fusión C-terminal muestra una menor eficacia en este sentido con una duración de 7,16 días con la administración diaria y 6,69 cada 3 días.

25 Los parámetros de sangre arterial (RBC, HGB, HCT) mostraron un ligero descenso durante el período de estudio en todos los grupos, lo que podría reflejar la pérdida de sangre causada por la extracción frecuente de muestras de sangre. Los recuentos de glóbulos blancos mostraron un ligero aumento que probablemente puede atribuirse al microtrauma causado por la extracción de muestras de sangre e inyecciones frecuentes. Sin embargo, este efecto destacó especialmente en los animales que recibieron la fusión N-terminal de IL-11 diariamente, de manera que en este grupo no puede excluirse un efecto relacionado con el tratamiento correspondiente en los niveles de WBC. Todos los animales mostraron un ligero aumento de peso corporal normal a lo largo del período de observación.

30 En resumen, el efecto más destacado puede observarse con la fusión de albúmina N-terminal de IL-11, mientras que la fusión C-terminal se comporta de manera comparable a IL-11 Neumega®. A pesar de que los niveles absolutos en el nadir no se ven afectadas de manera significativa, la proteína de fusión N-terminal es capaz de reducir la duración de los niveles por debajo de $500 \times 10^3/\mu\text{l}$ y conduce a una recuperación significativamente más pronunciada en comparación con IL-11 Neumega®.

Ejemplo 7: IL-11-proteína de fusión en un modelo en ratones de enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

35 En este modelo se induce la colitis en ratones a través de la administración oral de 3% de sal disódica del sulfato de dextrano (DSS) en agua del grifo. Se asignaron diez ratones por a los siguientes grupos de tratamiento.

Tabla 14: Programa de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis	Program. Apl.	Volumen	n
1	Solución de formulación, sin DSS	n.d	t = d 0-9 s.c.; 1x/día	0.2 ml	10
2	Solución de formulación	n.d	t = d 0-9 s.c.; 1x/día	0.2 ml	10
3	Sulfasalazina	100µg/kg	t = d 0-10; p.o.	<i>ad lib.</i>	10
4	IL-11 Neumega®	250µg/kg	t = d 0-9 s.c.; 1x/día	0.2 ml	10
5	IL-11-AFP C-term	1650µg/kg	t = d 0, 3, 6, 9 s.c.; 1x/día	0.2 ml	10
6	IL-11-AFP N-term (tipo B)	1650µg/kg	t = d 0, 3, 6, 9 s.c.; 1x/día	0.2 ml	10

Se evaluó el peso corporal, el sangrado rectal/diarrea y la sangre oculta en heces antes de la inducción y en los días 3, 6 y 9. El experimento se interrumpió el día 10, se practicó la autopsia a los animales, se midió la longitud del colon y se retuvieron muestras de intestino grueso para su evaluación histológica.

Resultados

Los animales que recibieron placebo, Sulfasalazina o IL-11 Neumega® perdieron peso después de la aparición de la colitis, mientras que los animales tratados con la fusión N- o C-terminal incluso ganaron peso (Figura 7). Este fue un efecto sorprendente de que no podía haberse previsto con antelación.

La puntuación de la observación visual que evalúa la diarrea y el sangrado rectal también muestra que hubo un sorprendente y significativo efecto beneficioso de las proteínas de fusión en comparación con el del placebo, Sulfasalazina o IL-11 Neumega®. (Figura 8). Lo mismo es cierto para la longitud del colon (Figura 9) y la puntuación histológica (Figura 10).

En resumen, estos datos muestran que ambas fusiones albúmina dadas en intervalos de 3 días son capaces de mejorar significativamente los síntomas de la colitis inducida por DSS en ratones, incluso superior a la IL-11 Neumega® o al actual tratamiento convencional con Sulfasalazina.

Ejemplo 8: Vida útil

Se determinó la vida útil de los productos IL-11 fusionados con albúmina de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se formuló un total de 25mg de productos IL-11 fusionados con albúmina a un volumen final de 5ml en un vial de vidrio en agua estéril para inyección, con glicina, heptahidrato dibásico de fosfato de sodio, y fosfato sódico monobásico como excipientes. Los viales de los productos se incubaron a 25°C durante 1 mes. Las muestras se sometieron a ensayo al final de un mes, como se describe en el Ejemplo 1 para las modificaciones post-traduccionales, mediante ESMS, secuencia N-terminal, geles de poliacrilamida SDS no reductores y membranas de Western. Se considera que la vida útil se prolonga si el compuesto presenta un menor número de cambios, en cualquiera de estas pruebas, después de este almacenamiento que el compuesto de IL-11 no fusionada.

Ejemplo 9: administración humana

Por lo menos en el caso del tratamiento de los cánceres, los productos de IL-11 fusionada con albúmina pueden administrarse mediante una única inyección subcutánea una vez cada cuatro días, con un régimen de dosis de 25-1.000 µg por kg de peso corporal, preferentemente 25-50 µg por kg.

Referencias

La presente invención no debe quedar limitada en su ámbito por las formas de realización específicas descritas que están concebidas como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y los componentes y procedimientos funcionalmente equivalentes están dentro del ámbito de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento se pondrán de manifiesto para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Tales modificaciones están destinadas a incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Delta Biotechnology Limited
<120> proteína de fusión a interleucina-11

40

<130> DELF P29719EP
 <140> 03027770.1
 <141> 13/12/03
 <160> 20
 5 <170> SeqWin99
 <210> 1
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido engarzador VC053
 <400> 1
 gatctttgga taagagagac gtcacaagt ccgaagtcgc tcaccggt 48
 <210> 2
 15 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223 > oligonucleótido engarzador VC054
 20 <400> 2
 ccttgaaccg gtgagcgact tcggacttgt gagcgtctct cttatccaaa 50
 <210> 3
 <211> 48
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido engarzador VC055
 <400> 3
 gatctttgga taagagagac gtcacaagt ccgaagtcgc tcatcgat 48
 30 <210> 4
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 220>
 35 <223> oligonucleótido engarzador VC056
 <400> 4
 ccttgaatcg atgagcgact tcggacttgt gagcgtctct cttatccaaa 50
 <210> 5
 <211> 86
 40 <212> ADN
 <213 > Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido engarzador VC057
 <400> 5
 45 **tcaaggacct aggtgaggaa aacttcaagg ctttgggtctt gatcgctttc gctcaatact 60**
tgcaacaatg tccattcgaa gatcac 86

ES 2 380 022 T3

<210> 6
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> oligonucleótido engarzador VC058

<400> 6

gtgatcttcg aatggacatt gttgcaagta ttgagcgaaa gcgatcaaga ccaaagcctt 60
gaagttttcc tcacctaggt 80

10 <210> 7
<211> 54
<212> ADN
<213> oligonucleótido cebador CF59

<400> 7
15 cgatagatct ttgataaga gaggccacc acctggcccc cctcgagttt cccc 54

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> polipéptido engarzador SEC ID 8

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

25 <210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> polipéptido engarzador SEC ID N° 9

<400> 9

Gly Gly Gly Ser
1

35 <210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> secuencia del péptido de señal de estañocalcina

<400> 10

40

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Leu Leu Val Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Ala

45 <210> 11

ES 2 380 022 T3

<211> 22
 <212> PRT
 <213> secuencia de señal consenso
 <400> 11

5

Met Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Pro Ala Arg Gly
 20

10 <210> 12
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> oligonucleótido cebador CF60
 <400> 12

ggccatcgat gagcgacttc ggacttgtga gcgtccagcc gagtcttcag cagcagcagt 60
 ccctc 66

20 <210> 13
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido cebador CF61

<400> 13
 ccggccttag gcttacctgg gccaccacct ggccccctc gaggttcccc 50

<210> 14
 <211> 45
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido cebador CF62

<400> 14
 35 ggccaagctt attacagcgg agtcttcagc agcagcagtc CCCTC 45

<210> 15
 <211> 2358
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> fusión IL11-albúmina N-terminal
 <400> 15

ES 2 380 022 T3

atgaagtggg ttttcatcgt ctccattttg ttettgttct cctctgctta ctctagatct 60
 ttggataaga gagggccacc acctggcccc cctcgagttt ccccagacc tggggccgag 120
 ctggacagca ccgtgctcct gaccgcctct ctctggcgg acacgcggca gctggctgca 180
 cagctgaggg acaaattccc agctgacggg gaccacaacc tggattccet gcccaccctg 240
 gccatgagtg cgggggcact gggagctcta cagctcccag gtgtgctgac aaggctgca 300
 gcggacctac tgtcctacct gcggcacgtg cagtggctgc gccgggcagg tggctcttcc 360
 ctgaagacc tggagcccga gctggggcacc ctgcaggccc gactggaccg gctgctgctc 420
 5 cggctgcagc tcctgatgct ccgcctggcc ctgccccagc ccccccgga cccgcggcg 480
 cccccgctgg cggccccctc ctccagcctgg gggggcatca gggccgcca cgccatcctg 540
 ggggggctgc acctgacact tgactgggccc gtgaggggac tgctgctgct gaagactcgg 600
 ctggacgctc acaagtccga agtcgctcat cgattcaagg acctaggtga ggaaaacttc 660
 aaggctttgg tcttgatcgc tttcgctcaa tacttgcaac aatgtccatt cgaagatcac 720
 gtcaagtgg tcaacgaagt taccgaattc gctaagactt gtgttgctga cgaatctgct 780
 gaaaactgtg acaagtccct gcacacctg ttcggtgata agttgtgtac tgttgctacc 840
 ttgagagaaa cctacgggtga aatggctgac tgttgctgta agcaagaacc agaaagaaac 900
 10 gaatgtttct tgcaacacaa ggacgacaac ccaaacttgc caagattggt tagaccagaa 960
 gttgacgtca tgtgtactgc tttccacgac aacgaagaaa ccttcttgaa gaagtacttg 1020
 tacgaaattg ctagaagaca cccatacttc tacgctccag aattgttgtt cttcgctaag 1080
 agatacaagg ctgctttcac cgaatgttgt caagctgctg ataaggctgc ttgtttgttg 1140
 ccaaagttgg atgaattgag agacgaaggt aaggcttctt ccgctaagca aagattgaag 1200
 tgtcttctct tgcaaaaagt cggtgaaaga gctttcaagg cttgggctgt cgctagattg 1260
 tctcaaagat tcccaaaggc tgaattcgct gaagtttcta agttggttac tgacttgact 1320
 aaggttcaca ctgaatgttg tcacggtgac ttgttggaat gtgctgatga cagagctgac 1380
 15 ttggctaagt acatctgtga aaaccaagac tctatctctt ccaagttgaa ggaatgttgt 1440
 gaaaagccat tgttgaaaaa gtctcactgt attgctgaag ttgaaaacga tgaatgcca 1500
 gctgacttgc catctttggc tgetgacttc gttgaatcta aggacgtttg taagaactac 1560
 gctgaagcta aggacgtctt ctgggtatg ttcttgtagc aatacgtag aagacacca 1620
 gactactccg ttgtcttgtt gttgagattg gctaagacct acgaaactac cttggaaaag 1680
 tgttgctgctg ctgctgaccc acacgaatgt tacgctaagg ttttcgatga attcaagcca 1740
 ttggtcgaag aaccacaaaa cttgatcaag caaaactgtg aattgttcga acaattgggt 1800
 gaatacaagt tccaaaacgc tttgttggtt agatacacta agaaggtccc acaagtctcc 1860
 accccaactt tggttgaagt ctctagaaac ttgggtaagg tcggttctaa gtgttgtaag 1920
 20 caccagaag ctaagagaat gccatgtgct gaagattact tgtccgctct tttgaaccaa 1980
 ttgtgtgttt tgcacgaaaa gaccccagtc tctgatagag tcaccaagtg ttgtactgaa 2040
 tctttggtta acagaagacc atgtttctct gctttggaag tcgacgaaac ttacgttcca 2100
 aaggaattca acgctgaac tttcacctc cacgctgata tctgtacctt gtccgaaaag 2160
 gaaagacaaa ttaagaagca aactgctttg gttgaattgg tcaagcaca gccaaggct 2220
 actaaggaac aattgaaggc tgtcatggat gatttcgctg ctttcgttga aaagtgttgt 2280
 aaggctgatg ataaggaac ttgtttcgct gaagaaggtg agaagttggt cgctgcttcc 2340
 25 caagctgctt tgggtttg 2358

<210> 16
 <211> 786
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> fusión IL11-albúmina N-terminal
 <400> 16

35 Met Lys Trp Val Phe Ile Val Ser Ile Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg
 20 25 30
 Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr
 35 40 45

ES 2 380 022 T3

Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp
 50 55 60
 Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu
 65 70 75 80
 5 Ala Met Ser Ala Gly Ala Leu Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu
 85 90 95
 Thr Arg Leu Arg Ala Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp
 100 105 110
 Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu
 115 120 125
 10 Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu
 130 135 140
 Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala
 145 150 155 160
 Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala
 165 170 175
 15 His Ala Ile Leu Gly Gly Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg
 180 185 190
 Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr Arg Leu Asp Ala His Lys Ser Glu Val
 195 200 205
 20 Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val
 210 215 220
 Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His
 225 230 235 240
 Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala
 245 250 255
 25 Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly
 260 265 270
 Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met
 275 280 285
 Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu
 290 295 300
 Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu
 305 310 315 320
 Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu
 325 330 335
 Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala
 340 345 350
 Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu
 355 360 365

ES 2 380 022 T3

Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp
 370 375 380
 Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys
 385 390 395 400
 Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala
 405 410 415
 Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val
 420 425 430
 Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His
 435 440 445
 Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr
 450 455 460
 Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
 465 470 475 480
 Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn
 485 490 495
 Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu
 500 505 510
 Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu
 515 520 525
 Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val
 530 535 540
 Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys
 545 550 555 560
 Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp
 565 570 575
 Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn
 580 585 590
 Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu
 595 600 605
 Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu
 610 615 620
 Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys
 625 630 635 640
 His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val
 645 650 655
 Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp
 660 665 670
 Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys
 675 680 685

Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn
 690 695 700
 Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys
 705 710 715 720
 5 Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His
 725 730 735
 Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe
 740 745 750
 10 Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys
 755 760 765
 Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
 770 775 780
 Gly Leu
 15 785
 <210> 17
 <211> 762
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> fusión IL11-albúmina N-terminal madura
 <400> 17

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

Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr Arg
 165 170 175
 Leu Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
 180 185 190
 5 Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
 195 200 205
 Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
 210 215 220
 Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
 225 230 235 240
 10 Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
 245 250 255
 Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu
 260 265 270
 Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn
 275 280 285
 15 Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe
 290 295 300
 His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala
 305 310 315 320
 20 Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
 325 330 335
 Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
 340 345 350
 Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala
 355 360 365
 25 Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
 370 375 380
 Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
 385 390 395 400
 Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
 405 410 415
 Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp
 420 425 430
 Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
 435 440 445
 Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
 450 455 460
 His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro
 465 470 475 480

	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr
					485					490					495	
	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala
				500					505					510		
5	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys
			515					520					525			
	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His
		530					535						540			
10	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu
	545					550					555					560
	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly
					565					570					575	
	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val
				580					585					590		
15	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly
			595					600					605			
	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro
		610					615					620				
20	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu
	625					630					635					640
	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu
					645					650					655	
	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu
				660					665					670		
25	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala
			675					680					685			
	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr
	690						695					700				
	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln
	705					710					715					720
	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys
					725					730					735	
	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu
				740					745					750		
	Val	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu						
				755				760								

ES 2 380 022 T3

<210> 18
 <211> 2361
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> fusión albúmina-IL11 C-terminal

<400> 18

10	atgaagtggg taagctttat ttccttctt tttctcttta gctcggctta ttccaggagc	60
	ttggataaaa gagatgcaca caagagtgag gttgctcatc ggtttaaaga tttgggagaa	120
	gaaaatttca aagccttggg gttgattgcc tttgctcagt atcttcagca gtgtccattt	180
	gaagatcatg taaaattagt gaatgaagta actgaatttg caaaaacatg tgttgctgat	240
	gagtcagctg aaaattgtga caaatcactt catacccttt ttggagacaa attatgcaca	300
	gttgcaactc ttcgtgaaac ctatggtgaa atggctgact gctgtgcaaa acaagaacct	360
	gagagaaatg aatgcttctt gcaacacaaa gatgacaacc caaacctccc ccgattggtg	420
	agaccagagg ttgatgtgat gtgactgct tttcatgaca atgaagagac atttttgaaa	480
	aaatacttat atgaaattgc cagaagacat ccttactttt atgccccgga actccttttc	540
15	tttgctaaaa ggtataaagc tgcttttaca gaatgttggc aagctgctga taaagctgcc	600
	tgcctgttgc caaagctcga tgaacttcgg gatgaaggga aggcttcgtc tgccaaacag	660
	agactcaagt gtgccagtct ccaaaaattt ggagaaagag ctttcaaagc atgggcagta	720
	gctcgcctga gccagagatt tcccaaagct gagtttgag aagtttccaa gttagtgaca	780
	gatcttacca aagtccacac ggaatgctgc catggagatc tgcttgaatg tgctgatgac	840
	agggcggacc ttgccaagta tatctgtgaa aatcaagatt cgatctccag taaactgaag	900
	gaatgctgtg aaaaacctct gttggaaaaa tcccactgca ttgccgaagt ggaaaatgat	960
	gagatgcctg ctgacttgcc ttcattagct gctgattttg ttgaaagtaa ggatgtttgc	1020
20	aaaaactatg ctgaggcaaa ggatgtcttc ctgggcatgt ttttgtatga atatgcaaga	1080
	aggcatcctg attactctgt cgtgctgctg ctgagacttg ccaagacata tgaaaccact	1140
	ctagagaagt gctgtgcccg tcagatcct catgaatgct atgccaaagt gttcgatgaa	1200
	tttaaacctc ttgtggaaga gcctcagaat ttaatcaaac aaaattgtga gctttttgag	1260
	cagcttgagg agtaciaaatt ccagaatgcg ctattagttc gttacaccaa gaaagtacct	1320
	caagtgtcaa ctccaactct tgtagaggtc tcaagaaacc taggaaaagt gggcagcaaa	1380
	tgttgtaaac atcctgaagc aaaaagaatg ccctgtgcag aagactatct atccgtggtc	1440
	ctgaaccagt tatgtgtggt gcatgagaaa acgccagtaa gtgacagagt caccaaatgc	1500
25	tgcacagaat ccttggtgaa caggcgacca tgcttttcag ctctggaagt cgatgaaaca	1560
	tacgttccca aagagtttaa tgcgaaaca ttcaccttc atgcagatat atgcacactt	1620
	tctgagaag agagacaaat caagaaaca actgcacttg ttgagctcgt gaaacacaag	1680
	cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagag	1740
	aagtgtgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttggt	1800
	getgcaagtc aagetgcett aggcttacct gggccaccac ctggcccccc tcgagtttcc	1860
	ccagaccctc gggccgagct ggacagcacc gtgctcctga cccgctctct cctggcggac	1920
	acgcggcagc tggctgcaca gctgaggggac aaattcccag ctgacgggga ccacaacctg	1980
30	gattccctgc ccaccctggc catgagtgcg ggggactgg gagctctaca gctcccagg	2040
	gtgctgacaa ggetgagcgc ggacctactg tccctacctg ggcacgtgca gtggctgagc	2100
	cgggcagggtg gctcttccct gaagaccctg gagcccagc tgggcacctt gcaggcccga	2160
	ctggaccggc tgctgagccg gctgcagctc ctgatgtccc gcctggccct gcccagcca	2220
	cccccgacc cgccggcgcc cccgctggcg cccccctct cagcctgggg gggcatcagg	2280
	gccgcccacg ccctcctggg ggggctgcac ctgacacttg actgggccgt gaggggactg	2340
	ctgctgctga agactcggct g	2361

35 <210> 19
 <211> 787
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> fusión albúmina-IL11 C-terminal

ES 2 380 022 T3

<400> 19

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
5 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 20 25 30

ES 2 380 022 T3

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 35 40 45
 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60
 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 5 65 70 75 80
 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95
 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110
 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 10 115 120 125
 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140
 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 15 165 170 175
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 20 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 25 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

ES 2 380 022 T3

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 5 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430
 10 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480
 15 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525
 20 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560
 25 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605
 Leu Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg
 610 615 620
 Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp
 625 630 635 640
 Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly
 645 650 655
 Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly Ala
 660 665 670

Leu Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asp
 675 680 685
 Leu Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly
 690 695 700
 5 Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg
 705 710 715 720
 Leu Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala
 725 730 735
 10 Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro
 740 745 750
 Ser Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly
 755 760 765
 Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys
 770 775 780
 15 Thr Arg Leu
 785
 <210> 20
 <211> 763
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> fusión IL11-albúmina C- terminal madura
 <400> 20
 25

	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu
	1				5					10					15	
	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln
				20					25					30		
5	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu
			35					40					45			
	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys
		50					55					60				
10	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
	65					70					75					80
	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro
					85					90					95	
	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu
			100						105					110		
15	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His
			115					120					125			
	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
		130					135					140				

ES 2 380 022 T3

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

ES 2 380 022 T3

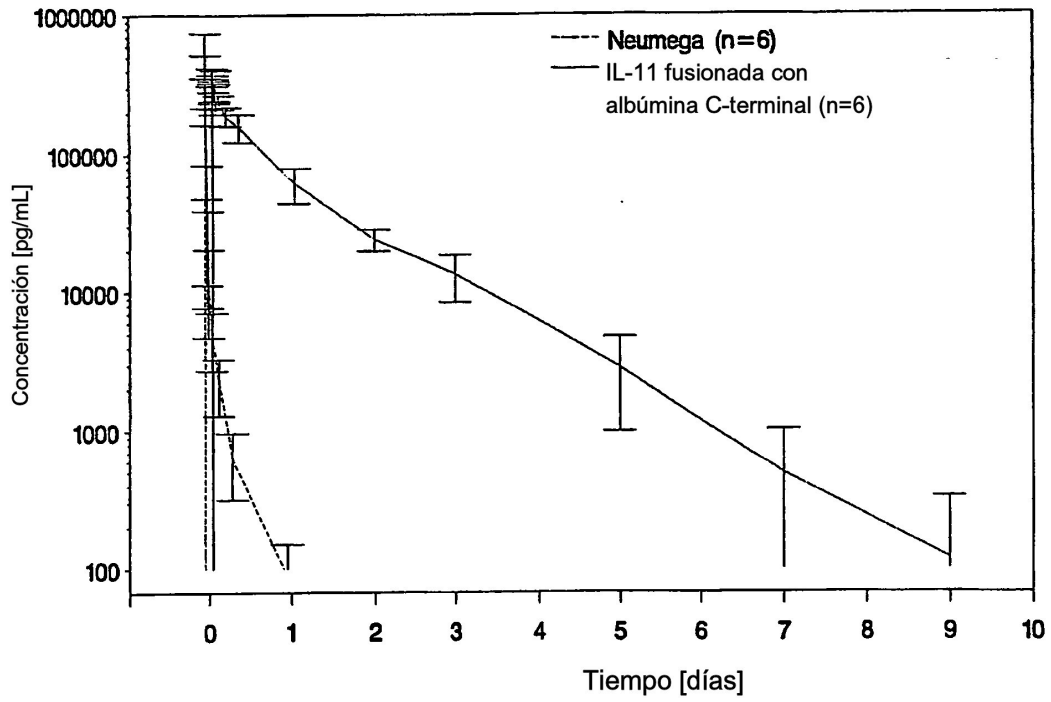
	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser
	465					470					475					480
	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr
					485					490					495	
5	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp
				500					505					510		
	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala
			515					520					525			
	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu
10		530					535					540				
	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys	Cys	Lys
	545					550					555					560
	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val
					565					570					575	
15	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro
				580					585						590	
	Pro	Arg	Val	Ser	Pro	Asp	Pro	Arg	Ala	Glu	Leu	Asp	Ser	Thr	Val	Leu
			595					600					605			
	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr	Arg	Gln	Leu	Ala	Ala	Gln	Leu
20		610					615					620				
	Arg	Asp	Lys	Phe	Pro	Ala	Asp	Gly	Asp	His	Asn	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro
	625					630					635					640
	Thr	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly
					645					650					655	
25	Val	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Asp	Leu	Leu	Ser	Tyr	Leu	Arg	His	Val
				660					665					670		
	Gln	Trp	Leu	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Pro
			675					680					685			
	Glu	Leu	Gly	Thr	Leu	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu
		690					695					700				
	Gln	Leu	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Asp	Pro
	705					710					715					720
	Pro	Ala	Pro	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Ala	Trp	Gly	Gly	Ile	Arg
					725					730					735	
	Ala	Ala	His	Ala	Ile	Leu	Gly	Gly	Leu	His	Leu	Thr	Leu	Asp	Trp	Ala
				740					745					750		
	Val	Arg	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Thr	Arg	Leu					
			755					760								

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de albúmina que comprende
 - i) IL-11 humana de longitud completa o fragmentos de IL-11 humana de longitud completa y
 - ii) albúmina humana de longitud completa o fragmentos de albúmina humana de longitud completa,
- 5 2. La proteína de fusión de albúmina de la reivindicación 1 en la que la IL-11 humana se fusiona al extremo terminal en la que dichos fragmentos son idénticos al menos un 90% a la IL-11 humana de longitud completa y/o la albúmina humana de longitud completa y en la que dichas deleciones no causan una pérdida sustancial de la función biológica, en la que la función biológica es la estimulación de la trombocitopoyesis.
- 10 3. La proteína de la reivindicación 2, por la que la semivida *in vivo* de dicha IL-11 fusionada con albúmina se prolonga al menos 10 veces cuando se administra por vía intravenosa a ratas en comparación con la semivida de dicha IL-11 que carece de la albúmina humana unida cuando también se administra por vía intravenosa a ratas.
- 15 4. La proteína de fusión de albúmina de la reivindicación 1 en la que la IL-11 humana se fusiona al extremo C-terminal de la albúmina humana.
5. La proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la IL-11 humana se separa de la albúmina humana mediante un engarzador.
- 20 6. La proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la actividad biológica *in vivo* de la IL-11 humana fusionada a la albúmina humana es igual o mayor que la actividad biológica *in vivo* de dicha IL-11 humana en un estado no fusionado.
7. La proteína de fusión de albúmina de la reivindicación 6 en la que la actividad biológica viene determinada por un aumento de los niveles medios de plaquetas en un modelo en ratas de la trombocitopenia inducida por quimioterapia.
- 25 8. La proteína de fusión de albúmina de la reivindicación 6 en la que la actividad biológica se determina por la reducción de la diarrea y del sangrado rectal en un modelo de ratón de la enfermedad inflamatoria intestinal, inducido por la sal disódica del sulfato de dextrano.
9. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 30 10. Un procedimiento para fabricar una proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el procedimiento (a) proporcionar un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de albúmina que puede expresarse en una célula u organismo; (b) expresar el ácido nucleico en la célula u organismo para formar una proteína de fusión de albúmina; y (c) purificar la proteína de fusión de albúmina.
- 35 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Una proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en medicina.
13. Una proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la trombocitopenia y/o de la trombocitopenia inducida por quimioterapia y/o de la enfermedad inflamatoria intestinal y/o de la enfermedad de von Willebrand.
- 40 14. Una proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso para minimizar un efecto secundario asociado con el tratamiento de un mamífero con la IL-11 humana que comprende administrar dicha proteína de fusión de albúmina a dicho mamífero.
- 45 15. Una proteína de fusión de albúmina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso para minimizar la pérdida de peso, el sangrado rectal o la diarrea asociados con el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en un mamífero con IL-11 humana que comprende administrar dicha proteína de fusión de albúmina a dicho mamífero.

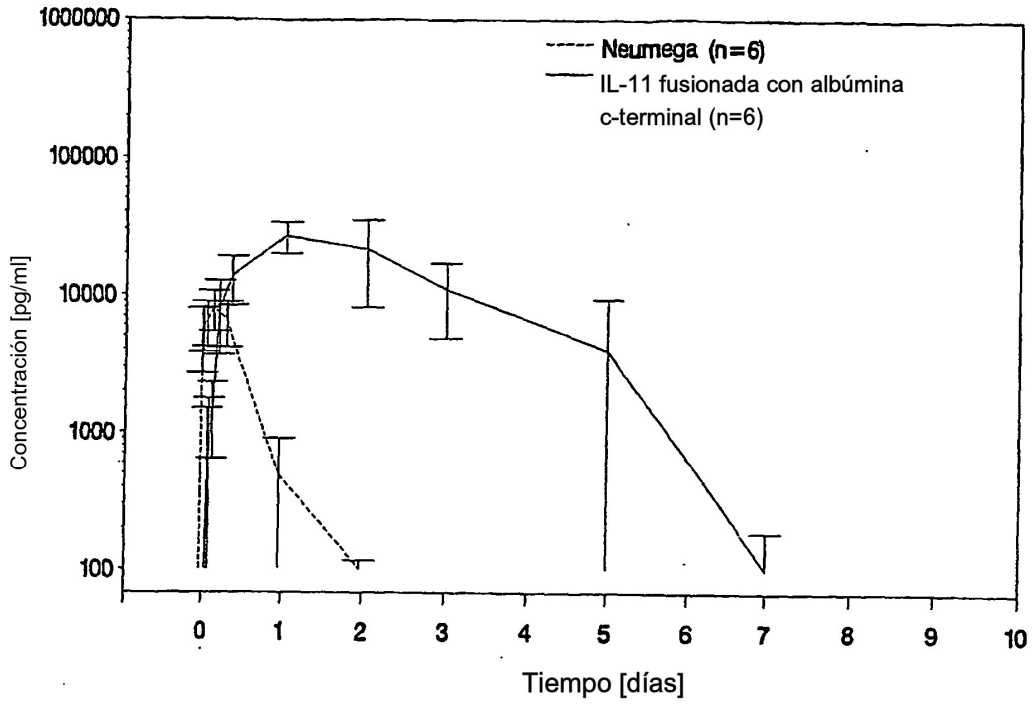
5

Figura 1: Concentraciones medias de IL-11 +/- DT , tras la aplicación i.v.



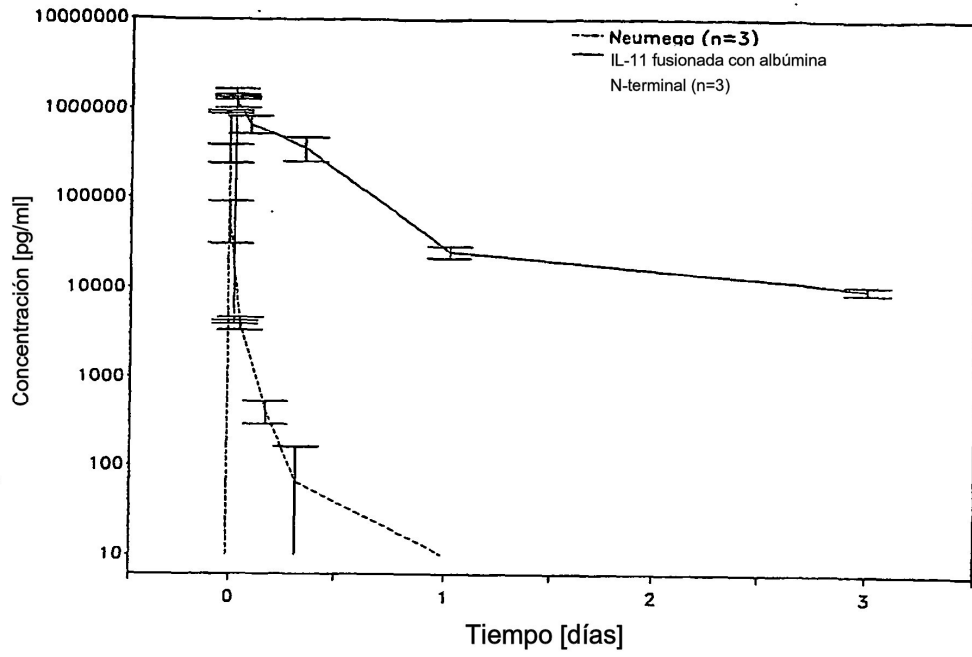
5

Figura 2: concentraciones medias de IL-11 +/- DT , tras la aplicación s.c.



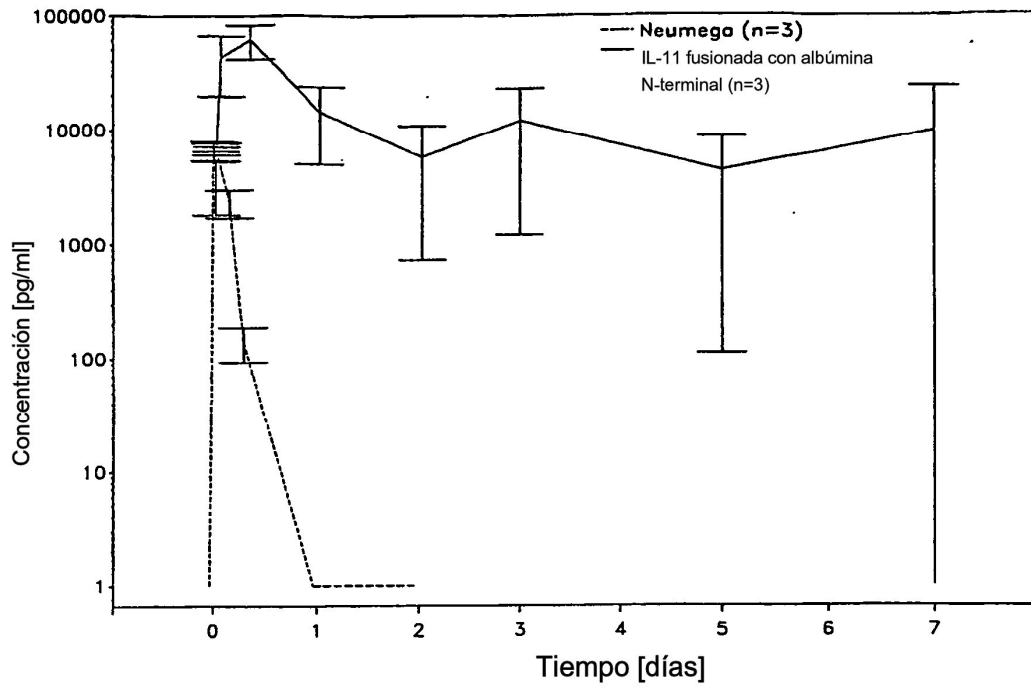
5

Figura 3: Concentraciones medias de IL-11 +/- DT, tras la administración intravenosa de rhIL-11 o fusión IL-11-albúmina N-terminal a ratas



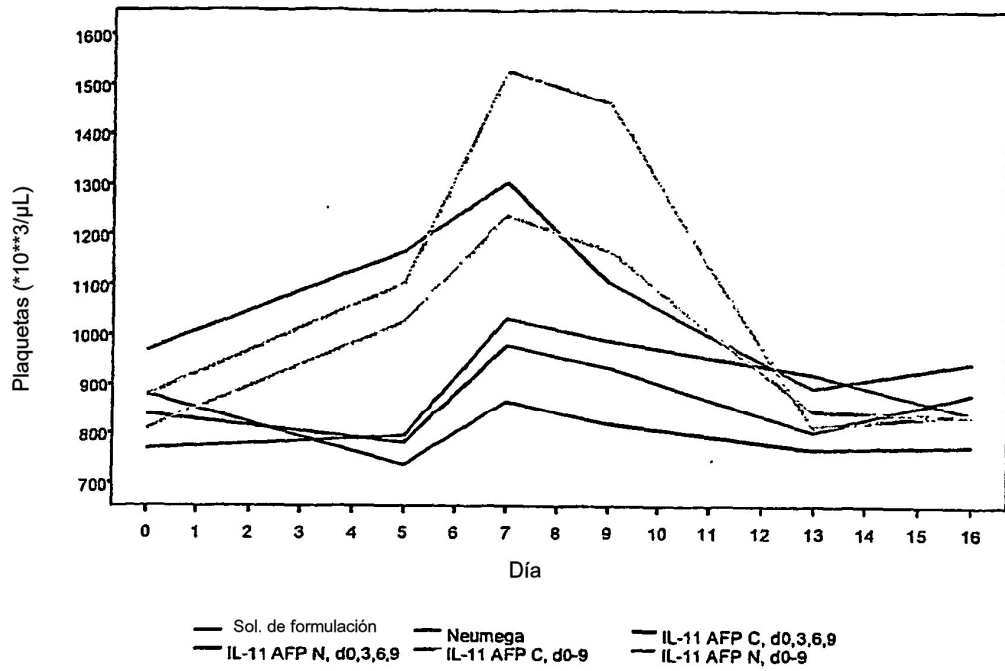
5

Figura 4: Concentraciones medias de IL-11 +/- DT, tras la administración subcutánea de rhIL-11 o fusión IL-11-albúmina N-terminal a ratas



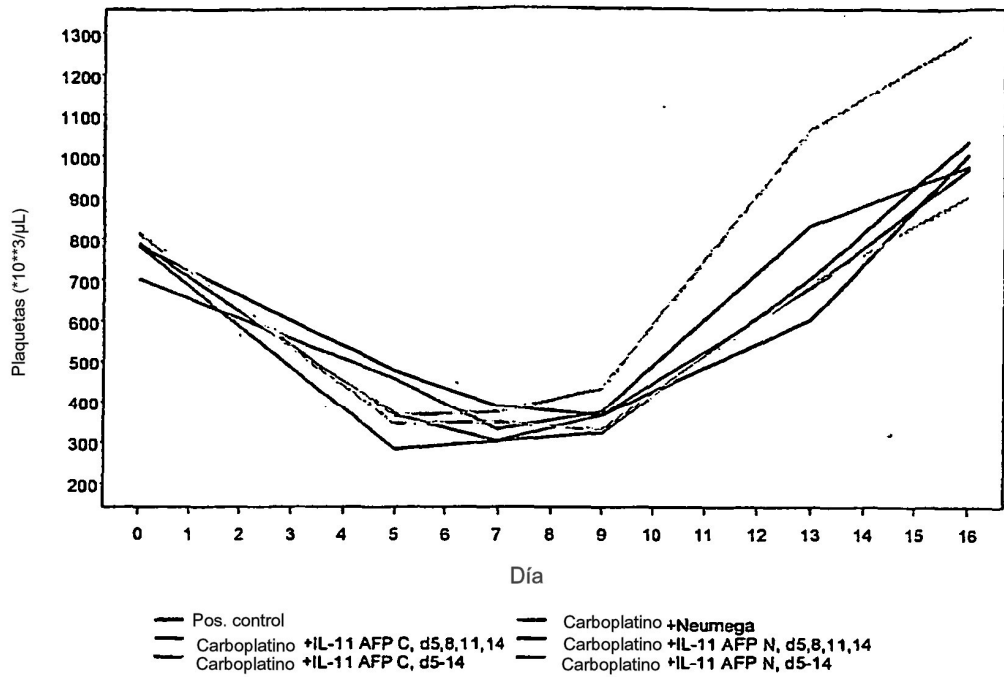
5

Figura 5: Trayectoria de los niveles de plaquetas tras el tratamiento de ratas sin tratamiento previo con IL 11 y fusiones de IL-11



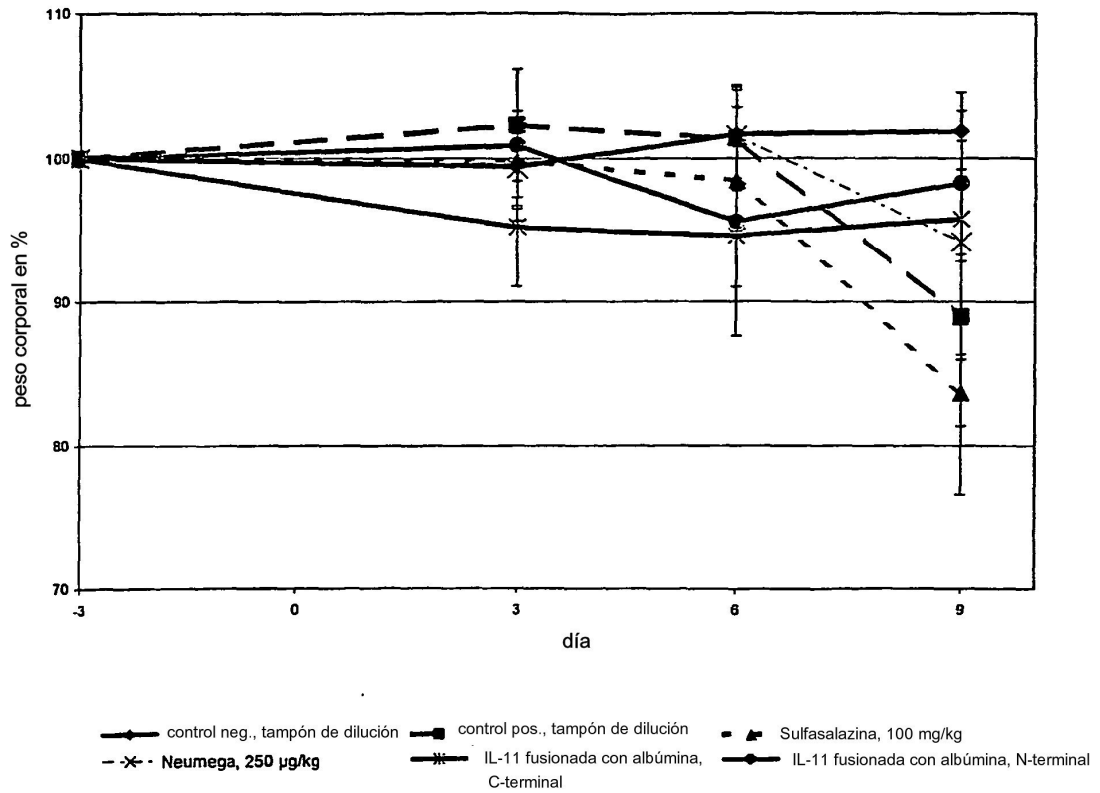
5

Figura 6: Trayectoria de los niveles de plaquetas tras el tratamiento de ratas sometidas a quimioterapia con IL 11 y fusiones de IL-11



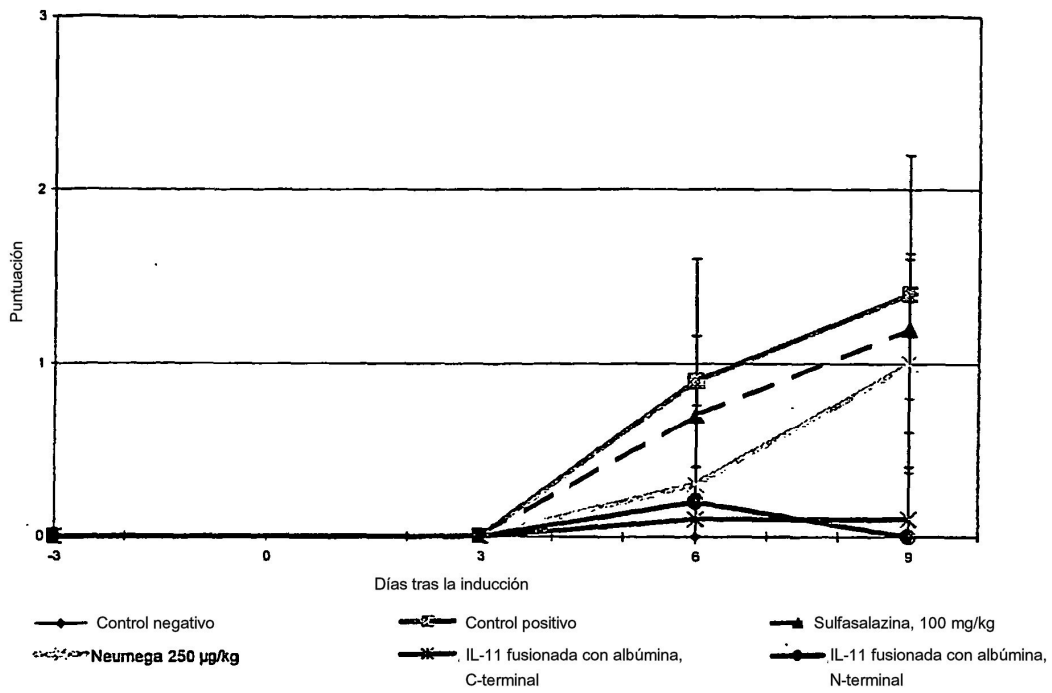
5

Figura 7: Desarrollo del peso corporal (en % del valor basal) tras la aplicación de IL-11 y fusiones de IL-11 en un modelo de ratón para EII



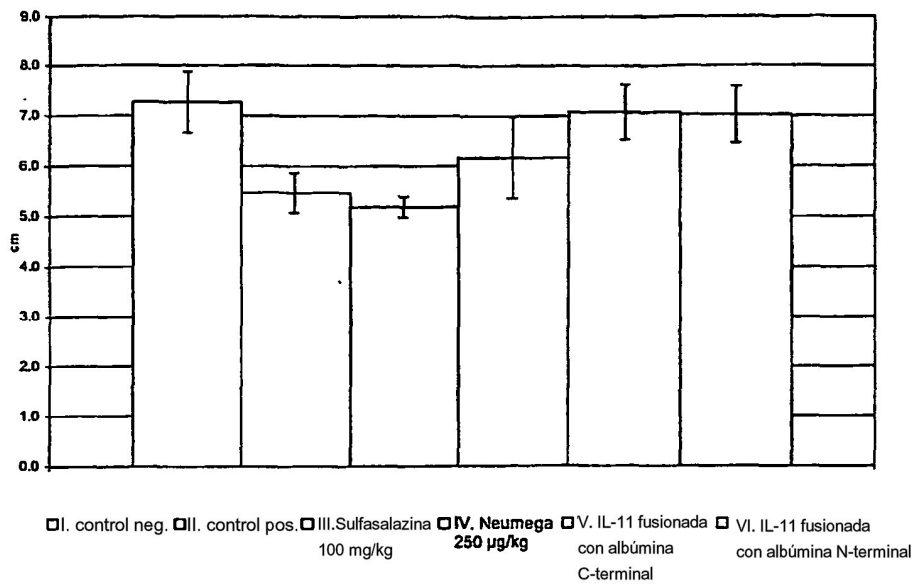
5

Figura 8: Puntuación de la observación visual (diarrea y sangrado rectal macroscópico) tras la aplicación de IL-1 y fusiones de IL-11 en un modelo de ratón para EII



5

Figura 9: Longitud del colon tras la aplicación de IL-11 y fusiones de IL-11 en un modelo de ratón para EII



5

Figura 10: Puntuación de la enfermedad histológica tras la aplicación de IL-11 y fusiones de IL-11 en un modelo de ratón para EII

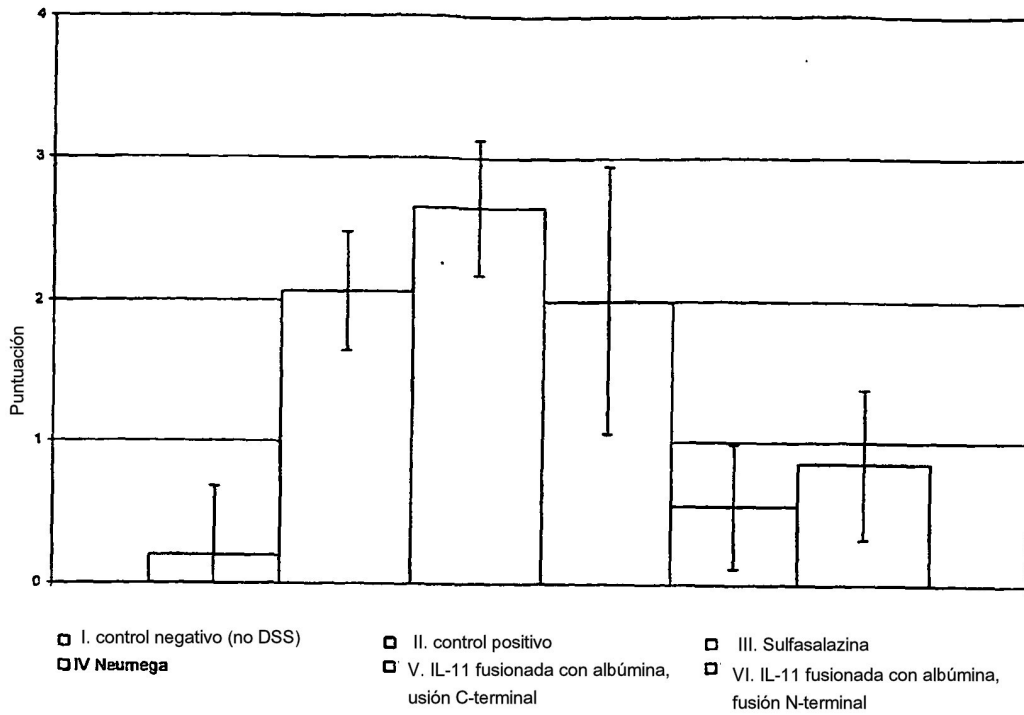
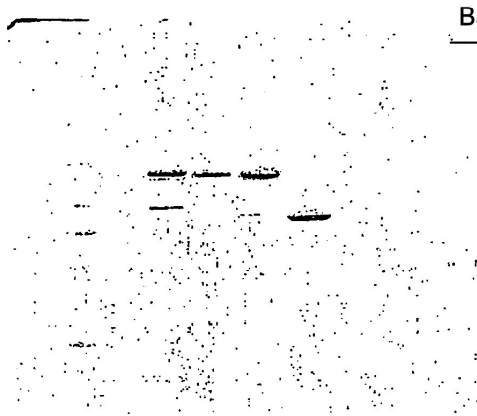


Figura 11: gel no reductor de SDS en gradiente al 12% y transferencia de Western

GEL AZUL COLOIDAL

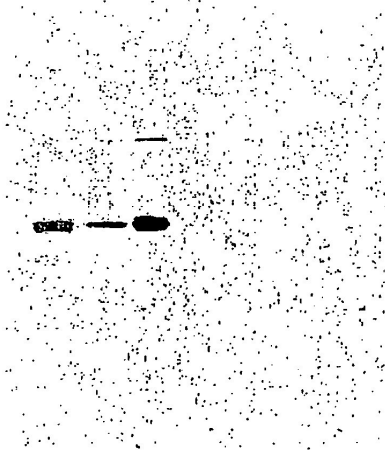
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Banda	Muestra	Carga
1.	-	-
2.	Rotulador	-
3.	-	-
4.	IL11 C Terminal (1721#11)	1µg
5.	IL11 N Terminal (Tipo A)	1µg
6.	IL11 N Terminal (Tipo B)	1µg
7.	HSA	1µg
8.	IL11 estándar (sólo transferencia IL11)	50ng
9	-	-
10	SPT9901	100ng

TRANSFERENCIA DE WESTERN ANTI-IL11

4 5 6 7 8 9 10



TRANSFERENCIA DE WESTERN ANTI-ASH

4 5 6 7 8 9 10

