

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 863**

51 Int. Cl.:
C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05764041 .9**
- 96 Fecha de presentación: **07.07.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1807518**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Alfa-fetoproteína recombinante, procedimiento y medios para la preparación de la misma, composiciones basadas en la misma y uso de la misma**

30 Prioridad:
14.07.2004 EA 200400907

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.07.2012

73 Titular/es:
Tatulov, Eduard Borisovich
Aviatorov ul. 8/1 - 148/149
Moscow 119619, RU

72 Inventor/es:
BENEVOLENSKY, Sergei Vladimirovich;
MARCHENKO, Alexei Nikolaevich;
KOZLOV, Dmitry Georgievich;
ZATSEPIN, Sergei Sergeevich;
SHINGAROVA, Lyudmila Nikolaevna;
DUDICH, Igor V.;
SEMENKOVA, Lidiya N.;
DUDICH, Dmitry I.;
TATULOV, Eduard Borisovich y
DUDICH, Elena I.

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

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).

ES 2 384 863 T3

DESCRIPCIÓN

Alfa-fetoproteína recombinante, procedimiento y medios para la preparación de la misma, composiciones basadas en la misma y uso de la misma

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a la industria microbiológica y médica, la ingeniería genética y la biotecnología. Se pretende una α -fetoproteína (AFP) recombinante según la presente invención, que retiene la actividad de la AFP humana y se obtiene a partir de suero, para uso en oncología, inmunoterapia y cosmetología.

Antecedentes de la invención

- 10 La alfa-fetoproteína (AFP) es el componente principal del suero sanguíneo embrionario de mamíferos, que se sintetiza por hígado embrionario y saco vitelino durante el desarrollo perinatal. Inmediatamente después del nacimiento, se reduce bruscamente el nivel de AFP en el suero y su expresión se vuelve indetectable en individuos adultos sanos (Deutsch H.F., 1991, Adv. Canc. Res. 56, 253-312). Se renueva la síntesis de AFP con el desarrollo maligno de tumores hepáticos y teratoblastomas germinogénicos, y podría ser detectable en menor grado en el caso de lesión química y mecánica del hígado acompañada de regeneración, por ejemplo, durante hepatitis vírica aguda o cirrosis (Mizejewsky G.J., 2002, Expert Rev. Anticancer. Ther. 2: 89-115).

- 20 La AFP humana es una glucoproteína consistente en 590 aminoácidos y que comprende aproximadamente un 4% de componente carbohidrato (Morinaga T., *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 4604-4608; Pucci P. *et al.*, 1991, Biochemistry 30, 5061-5066). Una de las propiedades principales de la AFP es la captación no covalente de diferentes sustancias químicas de bajo peso molecular, tales como ácidos grasos poliinsaturados, hormonas esteroideas, metales, retinoides, antibióticos hidrofóbicos y otros (Aussel S. y Masseyeff R., 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 119: 1122-1127; Deutsch H.F., 1994, J. Tumor Marker Oncol., 9: 11-14). En las etapas tempranas del desarrollo embrionario, la AFP reemplaza a la albúmina como vehículo de transporte de ácidos grasos y otras sustancias de bajo peso molecular (Deutsch H.F., 1991, Adv. Canc. Res. 56, 253-312).

- 25 La molécula de AFP consiste en tres dominios estructurales globulares unidos por 15 enlaces disulfuro intercatenarios que aumentan significativamente la complejidad del proceso de ensamblado de la estructura terciaria de una proteína (Morinaga T., *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 4604-4608; Pucci P., *et al.*, 1991, Biochemistry 30, 5061-5066). Además, es un elemento estructural importante de la molécula de AFP el componente carbohidrato, que proporciona una correcta recepción y funcionamiento de la molécula (Deutsch H.F., 1991, Adv. Canc. Res. 56, 253-312).

- 30 Además de la cadena polipeptídica consistente en 590 residuos aminoácidos, la estructura de la molécula de AFP embrionaria sérica o la secretada por células de hepatocarcinoma incluye un grupo oligosacárido ligado a asparagina según la glucosilación de tipo N (Yamashita K. *et al.*, 1993, Cancer Res. 53: 2970-2975). La estructura de una cadena oligosacárida de AFP es heterogénea y depende de diferentes factores: la etapa de desarrollo del hepatocarcinoma o la etapa de desarrollo del embrión. Los oligosacáridos afectan a las propiedades estructurales de la molécula de AFP, y podrían incluirse en el contenido de determinantes antigénicos y centros de unión a receptor (Deutsch H.F., 1991, Adv. Canc. Res. 56, 253-312). A diferencia de la AFP sérica, la AFP recombinante expresada en células bacterianas no está glucosilada, lo que es una distinción característica del producto caracterizado en los trabajos de Murgita (patentes de EE.UU. 6.331.611, 6.627.440, 6.416.734) y, en consecuencia, tiene propiedades estructurales y funcionales que la distinguen del análogo sérico y también de la AFP recombinante expresada en sistemas de levadura. Es conocido que, durante la expresión de proteínas heterólogas en levaduras, se lleva a cabo su glucosilación con respecto a los mismos residuos aminoácidos que en el análogo sérico, pero la estructura de los oligosacáridos mismos difiere significativamente con respecto a la constitución, longitud y ramificación de la cadena, lo que predetermina también ciertas distinciones en las propiedades estructurales y funcionales de las correspondientes proteínas (Hard K. *et al.*, 1998, FEBS Lett. 248: 111).

- 45 La AFP puede absorberse selectivamente por células que expresan receptores específicos de AFP (AFPR), tales como células embrionarias, citoblastos, células inmunitarias activadas, células cancerosas o células transformadas por ciertos tipos de retrovirus (Uriel J. *et al.*, 1989, en Jizejewsky G.I., Jakobson H.I. (eds): "Biological Properties of Alpha-Fetoprotein". Boca Ratón, CRC Press, vol. 2: 103-117). Las células maduras normales pierden la capacidad de absorber AFP y no expresan AFPR específicos. En vista de esta propiedad de la AFP, se han propuesto procedimientos para el uso terapéutico de AFP con el fin de orientar el suministro de citostáticos y otras sustancias a un tumor, suprimiendo el crecimiento de células cancerosas (Deutsch H.F., 1994, J. Tumor Marker Oncol. 9: 11-14; Tsukada Y. *et al.*, 1994, J. Tumor Marker Oncol. 9: 99-103).

- 55 La AFP tiene una serie de propiedades funcionales que se están estudiando intensamente en la actualidad. El concepto clásico de AFP como análogo de seroalbúmina embrionaria está actualmente complementado con datos referentes a la capacidad de la AFP de llevar a cabo la regulación del crecimiento, desarrollo y muerte programada de células (Mizejewsky G.J., 2002, Expert Rev. Anticancer. Ther. 2: 89-115). En particular, se ha mostrado que la AFP recombinante, de forma similar al análogo sérico y cultivado, es capaz de suprimir el crecimiento de tejidos tumorales y normales dependientes de estrógeno (Bennett J.A. *et al.*, 1997, Breast Cancer Res. Treat. 45, 169-179;

Bennet J.A. *et al.*, 1998, Clinical Cancer Research, 4, 2877-2884). Recientemente, se ha establecido que la actividad oncosupresora de la AFP se lleva a cabo de acuerdo con el mecanismo de desencadenamiento de la apoptosis, que se caracteriza por cambios morfológicos típicos, la detención del crecimiento, citotoxicidad y fragmentación de ADN (Semenkova L.N., 1997, Tumor Biol. 18, 261-274; Dudich E.I., *et al.*, 1998, Tumor Biol. 19, 30-40; Dudich E.I., *et al.*, 1999, Eur. J. Biochem. 266: 1-13; Semenkova L., *et al.*, 2003, Eur. J. Biochem. 70: 4388-4399).

Estudios anteriores han mostrado la capacidad de la AFP de regular la diferenciación y activación de células inmunitarias. En particular, la AFP es capaz de suprimir células inmunitarias activadas con aloantígenos o autoantígenos e inhibir la expresión de diversos genes de citocinas (Yamashita K., *et al.*, 1993, Cancer Res. 53, 2970-2975; patente de EE.UU. nº 5.965.528). Por otro lado, la AFP induce una notable estimulación del crecimiento de células de médula ósea inmaduras, citoblastos y células embrionarias (Dudich E.I., *et al.*, 1998, Tumor Biol. 19, 30-40; patente de EE.UU. nº 6.627.440).

Estas propiedades de la AFP, y también la selectividad aumentada de la absorción de AFP por células cancerosas *in vivo* (Uriel J., *et al.*, 1989, en Mizejewsky G.I., Jakobson H.I., eds: "Biological Properties of Alpha-Fetoprotein". Boca Ratón, CRC Press. vol. 2: 103-117), han revelado la base para su uso en medicina como preparación terapéutica en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias (patente de EE.UU. nº 5.965.528) y oncológicas (patente de EE.UU. nº 6.416.734; Mizejewsky G.J., 2002, Expert Rev. Anticancer. Ther. 2: 89-115). Además, la AFP se usa tradicionalmente como marcador oncoembrionario para el diagnóstico temprano de enfermedades oncológicas y patologías del desarrollo embrionario (Deutsch H.F., 1991, Adv. Canc. Res. 56, 253-312). Sin embargo, el uso de AFP natural como fármaco es tecnológicamente imposible debido a la deficiencia de material bruto.

Tradicionalmente, es una fuente para la obtención de AFP el suero sanguíneo de mujeres embarazadas, el suero embrionario de cordón umbilical o el fluido ascítico de pacientes de cáncer. Obviamente, ninguna de estas fuentes es aceptable para la producción de una sustancia proteica con fines médicos debido, en primer lugar, a que está extremadamente limitado el acceso a la fuente de material bruto y a que el contenido de AFP en el mismo es bajo, y en segundo lugar, existe el riesgo creciente de infección con virus o priones.

Se han publicado datos anteriormente respecto a la expresión y purificación de AFP recombinante (AFP_r) en diferentes microorganismos (Yamamoto R., *et al.*, 1990, Life Sciences, 46: 1679-1686; Nishi S., *et al.*, 1988, J. Biochem. 104: 968-972; patente de EE.UU. 5.206.153; patente de EE.UU. 6.331.611). Por tanto, se ha llevado a cabo la producción intracelular de AFP_r humana en *Saccharomyces cerevisiae* (Yamamoto R., *et al.*, 1990, Life Sciences, 46: 1679-1686; patente de EE.UU. 5.206.153) y *Escherichia coli* (patente de EE.UU. 6.331.611; Boismenu R., *et al.*, 1997, Protein Expression and Purification. 10: 10-26). Se ha mostrado que la AFP recombinante, expresada en *Escherichia coli*, retiene la actividad inmunoreguladora y oncosupresora del análogo embrionario (Boismenu R., *et al.*, 1997, Protein Expression and Purification. 10: 10-26; Bennett J.A., *et al.*, 1997, Breast Cancer Res. Treat. 45, 169-179). La principal desventaja de estos sistemas de expresión es la incapacidad de secretar proteína heteróloga y el nivel extremadamente bajo de su producción. Además, la obtención del producto deseado a partir de una biomasa de cepas productoras recombinantes requeriría llevar a cabo procedimientos adicionales de desnaturalización y renaturalización, que daban como resultado una reducción significativa del rendimiento del producto y, como consecuencia, un aumento sustancial de su coste. También en el caso de uso de sistemas de expresión bacterianos, es también importante el problema de la contaminación del producto con los lipopolisacáridos de la cubierta, que tienen actividad endotóxica conocida.

La solución técnica más similar a la presente invención es la cepa productora de AFP humana que se describe en las referencias (Yamamoto R., *et al.*, 1990, Life Sciences, 46: 1679-1686; patente de EE.UU. 5.206.153). En estas fuentes, se dan a conocer cepas productoras de levadura *Saccharomyces cerevisiae* con producción intracelular de AFP humana, cuya secuencia aminoacídica comprende una sección adicional correspondiente al péptido señal de AFP de rata. Esta invención identifica el producto de secreción de una cepa de levadura, teniendo dicho producto las propiedades de una AFP humana madura y la secuencia original SEQ ID NO: 2, que corresponde a la secuencia de una AFP humana madura. Esta especificidad distingue el producto descrito en la presente invención de los datos a conocer anteriormente (Yamamoto R., *et al.*, 1990, Life Sciences, 46: 1679-1686; patente de EE.UU. 5.206.153). Además, es una desventaja de esta cepa descrita en las referencias citadas la ausencia de mecanismos para el ensamblado intracelular y la secreción de AFP en un líquido de cultivo, lo que eleva significativamente el coste y hace más complejo el proceso de preparación de una AFP recombinante purificada en cantidades preparativas y proporciona un nivel extremadamente bajo de producción de AFP. Además, los autores del citado trabajo (Yamamoto R., *et al.*, 1990, Life Sciences, 46: 1679-1686; patente de EE.UU. 5.206.153) obtuvieron una AFP recombinante modificada cuya secuencia comprende también un péptido señal y ligador, lo que limita la posibilidad de su uso médico debido a la modificación de la estructura de la proteína, dando como resultado un cambio de la especificidad inmunológica y, como resultado de ello, un aumento del riesgo de patología inmunorreactiva con la administración intravenosa o subcutánea.

En el caso de producción por secreción heteróloga con células de levadura de proteínas para las que el plegamiento correcto tiene lugar con la formación de enlaces disulfuro (entre ellas la AFP), es importante el nivel de producción de disulfuro isomerasa de levadura (Pdi) con células productoras (Shusta E.V., *et al.*, 1998, Nat. Biotechnol. 16: 773-777). Además, se proporciona una acción sinérgica con esta enzima por una cantidad aumentada de proteína de levadura de tipo chaperona BiP (Robinson A.S., *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. 271: 10017-10022).

A pesar del hecho de se considera tradicionalmente que las levaduras son organismos exentos de proteinasas secretadas (Chung B.H. y Park K.S., 1998, Biotechnol. Bioeng. 57: 245-249), para una serie de proteínas, incluyendo HSA, se muestra su degradación en el transcurso del cultivo de levaduras, que está relacionada con la presencia de proteinasas aún no identificadas asociadas a la célula (Chung B.H. y Park K.S., 1998, Biotechnol. Bioeng. 57: 245-249; Kang H.A., *et al.*, 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 575-582). Todos los factores enumerados han de tomarse en cuenta durante la creación de una levadura productora de AFP secretada eficazmente a un líquido de cultivo.

Teniendo en cuenta los inconvenientes de los procedimientos existentes actualmente para la preparación de una AFP recombinante, resulta obvio que existe la necesidad de una mejora adicional de la tecnología de los sistemas de expresión y secreción de AFP recombinante, en particular, el desarrollo de nuevas cepas recombinantes que tengan la capacidad de una mayor expresión de proteína heteróloga con la provisión de un ensamblado intracelular de una estructura terciaria nativa y la posterior secreción del producto deseado al líquido de cultivo.

Por tanto, el requisito de desarrollo de procedimientos aplicables industrialmente para la preparación de AFP que, con respecto a sus propiedades, sería idéntica o similar a la AFP sérica humana y por tanto posibilitaría usarla en aquellos campos en que se usa tradicionalmente la AFP sérica humana, se deduce objetivamente a partir del estado de la técnica.

La consecución del objeto indicado es posible mediante la creación de una nueva cepa de microorganismos que puedan producir en medio de cultivo un polipéptido idéntico o similar a la AFP sérica humana con respecto a sus propiedades.

20 Sumario de la invención

Para preparar una AFP recombinante cuyas propiedades sean idénticas o similares a las propiedades de una AFP sérica humana, era necesario desarrollar una cepa productora que proporcione la síntesis y producción de AFP en forma soluble secretada.

Se obtuvo la cepa productora con el uso de procedimientos de ingeniería genética, transformando una cepa original con un plásmido que comprendía una secuencia de ADN que codificaba una proteína que tenía la actividad de una AFP humana madura.

Una AFP secretada recombinante producida en un sistema de expresión de levadura tiene propiedades idénticas o similares a las propiedades de una AFP humana madura, que se determinan en un análisis inmunológico y por su capacidad de suprimir el crecimiento de células Raji de linfoma de linfocitos B y otras líneas celulares humanas sensibles a la acción apoptogénica en un cultivo *in vitro*. Esto proporciona un mecanismo de acción idéntico a la AFP obtenida y a una AFP sérica humana madura obtenida mediante un procedimiento tradicional y que tiene una secuencia aminoacídica presentada como la SEQ ID NO: 2. Las condiciones para llevar a cabo el procedimiento de preparación de AFP según la presente invención proporcionan el ensamblado de un polipéptido con defectos mínimos en comparación con la AFP humana nativa.

La similitud de las propiedades de la AFP recombinante humana producida en levaduras y la AFP sérica humana se proporciona por la inclusión en la composición del plásmido de un módulo de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica una AFP humana madura, porque el proceso de aislamiento no requiere una etapa de desnaturalización-renaturalización y porque al mismo tiempo se proporciona la glucosilación del polipéptido obtenido, y también el plegamiento de la molécula y la formación de enlaces disulfuro. La AFP humana recombinante producida en forma secretada en un sistema de expresión de levadura difiere del análogo recombinante producido en un sistema de expresión proeucariótico en que está glucosilada según el tipo N, mientras que la AFP bacteriana recombinante descrita en patentes (Murgita R.A. patentes de EE.UU. 6.331.611, 6.627.440, 6.416.734) no está glucosilada. La AFP recombinante humana producida en forma secretada en un sistema de expresión de levadura difiere del análogo sérico por la composición y estructura de la cadena oligosacáridica, que se determina por la cepa de levadura y la composición de los azúcares incluidos en el medio nutriente.

Para obtener un alto rendimiento de la proteína secretada con la actividad requerida de una célula hospedadora, se añadieron varios genes adicionales al plásmido que codifica el gen de AFP, proporcionando los genes adicionales un alto nivel de transcripción génica, plegamiento de las proteínas en el proceso de secreción y formación correcta de puentes disulfuro.

Como resultado, se obtuvo un plásmido pKX que tenía la capacidad de transformar células para la expresión y secreción de AFP.

Se obtuvo una célula productora eucariótica que tenía la capacidad de secretar alfa-fetoproteína recombinante con la ayuda del plásmido anteriormente citado.

En una variante preferible, se usó una cepa receptora de *Saccharomyces cerevisiae* YBS723 como célula inicial, transformándose esta cepa por el plásmido pKX para obtener una cepa productora *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX, depositada en la Russian Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) con el n° Y-3115.

Durante el cultivo de la cepa transformada, se secreta AFP a un medio del que puede aislarse en forma pura con el uso de procedimientos bioquímicos tradicionales.

5 Se usa una AFP aislada obtenida a partir de células transformadas como contenido de una composición farmacéutica que inhibe el crecimiento de células tumorales, que comprende la AFP obtenida y portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se usa una AFP aislada en la constitución de una composición sinérgica que inhibe el crecimiento de células tumorales, que comprende la AFP obtenida, preparaciones quimioterapéuticas y portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Con el uso de AFP aislada, una composición farmacéutica basada en la misma o que comprende su composición sinérgica, se ha desarrollado un procedimiento para tratar cáncer o prevenir su desarrollo que supone la administración a un paciente de una cantidad eficaz de AFP, composición farmacéutica o composición sinérgica.

Puesto que la AFP obtenida es similar con respecto a las propiedades a la AFP sérica humana, se usa la AFP obtenida en la constitución de una composición sinérgica que tenga acción inmunosupresora e inmunoreguladora, en la que la composición comprende AFP y ciclosporina C y portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 Se ha desarrollado un procedimiento para tratar enfermedades autoinmunitarias y corregir el estado inmunitario con el uso de la AFP aislada o la composición sinérgica anteriormente citada, comprendiendo el procedimiento la administración a un paciente de una cantidad eficaz de una AFP o una composición sinérgica con ciclosporina C.

20 En vista de la capacidad de la AFP de estimular el crecimiento de citoblastos, los inventores han propuesto una composición farmacéutica que estimula el crecimiento de citoblastos, comprendiendo la composición la AFP obtenida y portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables, y se propone también una composición sinérgica que estimula el crecimiento de citoblastos, comprendiendo esta composición la AFP obtenida y derivados de las vitaminas A, E, D, antioxidantes, hormonas esteroideas, isoflavonas de origen vegetal y portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 Se propone un procedimiento para la estimulación del crecimiento de citoblastos *in vitro* con el uso de AFP aislada o la composición farmacéutica o sinérgica anteriormente citada, comprendiendo el procedimiento actuar sobre las células con una cantidad eficaz de AFP o las correspondientes composiciones.

Además, se propone un procedimiento para estimular el crecimiento de citoblastos *in vivo*, comprendiendo el procedimiento administrar a un paciente una cantidad eficaz de AFP o de la composición farmacéutica o sinérgica anteriormente citada.

30 Se propone una composición cosmética para rejuvenecer la piel y evitar el envejecimiento basándose en la actividad funcional de la AFP aislada, comprendiendo la composición la AFP obtenida con portadores y excipientes aceptables en cosmetología y, opcionalmente, derivados de las vitaminas A, E, D, antioxidantes, hormonas esteroideas e isoflavonas de origen vegetal.

35 Se propone un procedimiento de uso de la composición cosmética obtenida para rejuvenecer la piel y evitar el envejecimiento de la piel dentro del marco de la presente invención, comprendiendo el procedimiento aplicar la composición sobre la piel de un individuo.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos ilustran las materias en cuestión de la invención presentadas.

40 La Fig. 1 muestra la estructura de un plásmido pKX que codifica la secuencia de una alfa-fetoproteína humana madura, que comprende un módulo de expresión con un gen de alfa-proteína humana, un fragmento de un plásmido bacteriano pUC18, una región de inicio de la replicación de un plásmido de levadura de 2 μ m, un marcador de levadura PGK1 selectivo, un gen PD11 que codifica una enzima disulfuro isomerasa y un gen KAR2 que proporciona el correcto ensamblado de la proteína y la secreción del producto deseado a un medio de cultivo.

45 La Fig. 2 muestra la estructura de un módulo de expresión que comprende una secuencia que codifica una alfa-fetoproteína humana en la composición de un plásmido pKX. La región promotora del gen de levadura GAL1 se muestra en cursiva. La región prepro de secreción del gen de levadura MFa1 se muestra en negrita. La secuencia aminoacídica de la molécula de alfa-fetoproteína humana se muestra en mayúsculas.

50 La Fig. 3 demuestra la estructura de un gen sintético que codifica AFP y consistente en los codones de levadura usados más frecuentemente. La secuencia aminoacídica de AFP, que es idéntica a la secuencia aminoacídica de la AFP humana sérica, se destaca en negrita.

La Fig. 4 muestra los resultados de electroforesis en PAGE-SDS (A) y análisis de inmunotransferencia (B) de diferentes cantidades, aplicadas en una línea, de una alfa-fetoproteína recombinante purificada obtenida a partir de un líquido de cultivo del cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX.

1. Proteínas marcadoras (94, 67, 43, 30, 20 kDa).
2. AFPPr después de cromatografía de afinidad en una columna con anticuerpo anti-AFP-Sepharose (0,3 µg).
3. AFPPr después de cromatografía en gel en una columna con Sephacryl S-200 (0,4 µg).
4. AFPPr (0,1 µg).
- 5 5. AFPPr después de Sephacryl S-200 (0,6 µg).
6. AFPPr después de Sephacryl S-200 (0,5 µg).
7. AFPe embrionaria (0,4 µg).

10 La Fig. 5 muestra la dependencia de la dosis de la proliferación de células Raji de linfoma de linfocitos B sobre la concentración de AFP para dos muestras diferentes de AFP purificada, que se obtienen a partir de AFPe sérica embrionaria y AFPPr recombinante, que se expresa por la cepa de levadura productora *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX. Se midió la proliferación de las células mediante la incorporación de [³H]-timidina y se expresó en porcentaje de inhibición del crecimiento en cultivos experimentales después de 12 h de incubación con AFP con respecto a un control sin aditivos.

15 La Fig. 6 demuestra: (A) la potenciación sinérgica de la acción oncosupresora de la doxorubicina con respecto a células U937 de mieloblastoma con el uso combinado con AFPPr según la presente invención; (B) la potenciación sinérgica del efecto oncosupresor general con el uso combinado de AFPPr según la presente invención y ácido retinoico (pro-vitamina A, ácida). La proliferación de las células se midió mediante la incorporación de [³H]-timidina y se expresó en porcentaje de la inhibición del crecimiento en cultivos experimentales después de 12 h de incubación con AFP con respecto a un control sin aditivos.

20 La Fig. 7 muestra el efecto estimulante de AFPPr según la presente invención sobre el crecimiento de citoblastos embrionarios obtenidos a partir de un cultivo primario de células de pulmón y retina embrionarios. Se midió la proliferación de las células mediante un procedimiento estándar de incorporación de [³H]-timidina durante las últimas 4 horas de cultivo y se expresó en porcentaje de la estimulación del crecimiento en cultivos de ensayo con respecto a un control sin AFP.

25 La lista de secuencias comprende las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, que son respectivamente la secuencia nucleotídica de un módulo de expresión que comprende la secuencia codificante de una alfa-fetoproteína humana en la composición de un plásmido pKX y la secuencia aminoacídica de una AFP humana madura.

30 La secuencia nucleotídica de un módulo de expresión comprende una región promotora del gen de levadura GAL1, una región prepro de secreción del gen de levadura MFα1, la secuencia codificante de un gen de alfa-fetoproteína humana y un campo de terminación de la transcripción de un gen de levadura CYC1. Este módulo de expresión está incluido en la composición del plásmido pKX que codifica la secuencia de una alfa-fetoproteína humana madura en una cepa de levadura productora de un sistema de *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX.

Descripción detallada de la invención

35 Para realizar la presente invención, el principal objeto técnico era la creación de una cepa de levadura productora de AFP capaz de secretar eficazmente la proteína deseada en un líquido de cultivo. El objeto se consigue construyendo un plásmido de ADN recombinante pKX que codifica la síntesis regulada de AFP humana y la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX que proporciona la síntesis y producción de AFP en forma disuelta secretada con un nivel de expresión no inferior a 10 mg/l. El alto nivel de síntesis de la proteína deseada en forma disuelta secretada se proporciona porque el plásmido pKX comprende un promotor del gen GAL1 con amplificación simultánea del gen KAR2 (Robinson A.S., *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 10017-10022), que codifica una proteína de unión a cadena pesada chaperona BiP. En el genoma de la cepa del receptor, hay amplificación del gen PD11 (Robinson A.S., *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 10017-10022), que codifica una enzima disulfuro isomerasa que participa en la formación de enlaces disulfuro durante el proceso secretor de las proteínas.

45 El ADN de plásmido recombinante comprende un gen de AFP humana bajo el control de un gen promotor de GAL1, que proporciona un alto nivel de transcripción del gen, y un gen KAR2, que codifica una proteína de unión a cadena pesada chaperona BiP, que participa en el plegamiento de proteínas durante el proceso secretor de las proteínas y proporciona un alto nivel de producción de la proteína deseada en el líquido de cultivo. Además, para proporcionar la correcta formación de enlaces disulfuro y la formación de una estructura terciaria nativa de la proteína, se usa un gen PS11 que codifica la disulfuro isomerasa.

50 Se caracteriza el ADN del plásmido pKX recombinante (Fig. 1), que codifica un gen de AFP humana, por los siguientes rasgos:

- es un plásmido de expresión para la secreción eficaz de AFP humana;

- tiene un tamaño de 13301 pb;
 - comprende un fragmento que codifica la secuencia aminoacídica de una alfa-fetoproteína humana madura de SEQ ID NO: 2;
 - comprende un fragmento del plásmido bacteriano pUC18, una región de inicio del plásmido de levadura de 2 µm, un marcador de levadura selectivo PGK1, un gen de levadura KAR2 que codifica una proteína de unión a cadena pesada chaperona BiP, un gen PD11 que codifica una enzima disulfuro isomerasa y un módulo de expresión con un genoma de AFP;
 - en la estructura del módulo de expresión presentado por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:1 se incluyen: una región promotora del gen de levadura GAL1, una región prepro de secreción del gen de levadura MFα1, una región que codifica una AFP humana madura y un campo de terminación de la transcripción de un gen de levadura CYC1. Cuando se introduce este plásmido en una célula, se consigue un alto nivel de transcripción del gen de AFP debido al uso de un promotor de GAL1 altamente eficaz. La introducción de una región prepro de secreción de MFα1 proporciona el procesamiento secretor correcto de la AFP, acompañado de la secreción eficaz de la proteína con la secuencia aminoacídica esperada de SEQ ID NO: 2, si la región codificante correspondiera con la secuencia de ADN que codifica una AFP humana madura en un líquido de cultivo;
 - una distinción significativa de la construcción de plásmido propuesta es que el gen *afp* está bajo el control de un promotor de GAL1 altamente eficaz, y para proporcionar la correcta formación de puentes disulfuro y la formación de una estructura terciaria nativa de la proteína, se usan los genes PD11 y KAR2.
- Cualquier célula eucariótica susceptible de dicha transformación con el plásmido indicado puede transformarse con la ayuda del plásmido creado. La selección de la célula no es crítica, puesto que los procedimientos y etapas de transformación son bien conocidos por los especialistas en la materia. Sin embargo, dependiendo del tipo de célula y las condiciones de cultivo del transformante obtenido, puede variar el nivel de expresión de AFP, pero el hecho de la expresión del péptido requerido tendrá lugar en condiciones de transformación exitosa de la célula original.
- Se usa una cepa receptora YBS723 de genotipo *pgk1/pgk1* para obtener la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX. La homocigosis de *pgk1/pgk1* hace a esta cepa incapaz de crecimiento en todos los medios que contengan cualquier fuente individual de carbono digerible normalmente por levaduras *S. cerevisiae*. La homocigosis de *ga180*: :PD11/*ga180*: :PD11 da como resultado un cambio de la regulación del promotor del gen GAL1 con la amplificación simultánea del genoma del gen PD11 que codifica la enzima disulfuro isomerasa y la participación en la formación de enlaces disulfuro durante el proceso secretor de las proteínas.
- La cepa YBS723 se transforma por el plásmido pKX según el procedimiento (Ito H., *et al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163-168). Se seleccionaron los transformantes según la capacidad de crecer en medio de levadura completo (bactopeptona - 20 g/l, extracto de levadura - 10 g/l, bactoagar - 20 g/l) que comprende 2% de glucosa como fuente de carbono. Uno de dichos clones se designa como YBS723/pKX.
- La cepa de levadura diploide obtenida *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX se caracteriza por los siguientes rasgos:
- Rasgos genéticos:** Genotipo *pgk1/pgk1 ga180*: :PD11/*ga180*: :PD11.
- Rasgos morfológicos:** Las células vegetativas de un cultivo de 48 horas cultivado en medio nutriente sólido con 2% de glucosa como única fuente de carbono tienen forma oval, un tamaño de célula de 3,6 x 7,1 µm, el protoplasma es homogéneo y la reproducción es por gemación. Cuando se cultivan en un medio sólido que comprende extracto de levadura y peptona (YEP) a 30°C después de 72 h de crecimiento, las columnas tienen la siguiente apariencia:
- 1) en medio YEP con glucosa- una columna de color blanco de borde liso, superficie brillante, perfil en forma de cono y consistencia de tipo crema;
 - 2) en medio YEP con almidón- una columna de color blanco de borde pautado, superficie mate, perfil de tipo lenticular y consistencia granulosa;
 - 3) en medio YEP con melazas- una columna de color blanco con superficie mate arrugada, borde pautado, perfil convexo y consistencia de tipo crema.
- Crecimiento en medio líquido:** En medio YEP con almidón a 32°C durante las primeras 24 horas de cultivo- un líquido turbio, de residuo blanco, no se apelmaza y no forma películas parietales.
- Rasgos físicoquímicos:** Anaerobia facultativa. Temperatura de crecimiento: 23-33°C (óptima, 31°C). pH de cultivo, 3,8-6,7 (óptimo, 5,0). Se observa el mayor nivel de secreción de AFP a pH 6,8-7,0.
- Asimilación de fuentes de carbono:** Fermenta glucosa, galactosa, fructosa, maltosa, sacarosa, dextrina y almidón.
- Asimilación de fuentes de nitrógeno:** Asimila aminoácidos, urea, sulfato de amonio y nitrato de amonio.

Especificidades distintivas: En el caso de cultivo en un medio rico en almidón (2%), zonas de almidón consumido rodeadas por un borde oscuro después de incubación del disco a +4°C durante 24 h.

Patogenicidad: La cepa *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX no es patogénica.

5 *Procedimiento de almacenamiento:* Se almacena la cepa en un medio rico en agarosa con glucosa durante 3 meses a +4°C.

Se deposita la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX obtenida, productora de AFP en forma secretada, en la Russian Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) con el nº Y-3115.

La cepa celular productora de AFP recombinante propuesta por los solicitantes tiene una serie de ventajas frente a los prototipos ya existentes:

- 10 - la producción del producto deseado se lleva a cabo en forma secretada en un líquido de cultivo;
- la secuencia aminoacídica del producto final corresponde a la secuencia de una AFP humana madura de SEQ ID NO: 2;
- de forma similar al análogo embrionario sérico, la AFP_r producida por la cepa productora *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX está glucosilada;
- 15 - el rendimiento del producto deseado aumenta significativamente debido al aumento de expresión del gen que codifica la enzima disulfuro isomerasa PD11, que proporciona la formación de enlaces disulfuro, y el gen KAR2, que codifica la proteína de unión a cadena pesada chaperona BiP, que proporciona un correcto ensamblado de la proteína y secreción del producto deseado al medio de cultivo.

20 Resulta completamente obvio que la secuencia que codifica el ADN puede comprender sustituciones relacionadas con la degeneración del código genético, y también algunas sustituciones, inserciones y deleciones que en conjunto no den como resultado la obtención de formas inactivas de la fetoproteína. Las posibles variaciones son conocidas por los especialistas en la materia. El polipéptido obtenido puede incluir también en el marco de la secuencia aminoacídica sustituciones aminoacídicas conservativas que supongan la sustitución se un aminoácido por otro que tenga propiedades similares. Sin embargo, dentro de los límites de los rasgos reivindicados de la presente invención, están solo aquellos polipéptidos que tengan una estructura primaria, secundaria y terciaria que no altere la actividad requerida del polipéptido obtenido, en particular, que tengan propiedades idénticas o similares a las propiedades de la AFP humana madura, determinadas en un análisis inmunológico y de acuerdo con su capacidad de suprimir el crecimiento de células Raji de linfoma de linfocitos B en un cultivo *in vitro*.

30 Se determinan los índices de actividad funcional, en la que se considera que el polipéptido obtenido tendrá las propiedades de una AFP sérica humana madura, según la reacción inmunológica y según su capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de células Raji de linfoma de linfocitos B a un nivel no inferior al 10% de la actividad de una AFP sérica humana madura.

35 En el caso del uso práctico del polipéptido obtenido en la constitución de una composición, se usan componentes adicionales tradicionales tales como excipientes, diluyentes, conservantes, soluciones tampón, solución fisiológica, una solución de cloruro de sodio al 0,9%, aditivos tecnológicos usados durante la producción de formas farmacológicas, etc. Las composiciones pueden ser fluidas (soluciones, suspensiones, cremas, emulsiones, etc.), sólidas (polvo liofilizado, reconstituido antes del uso, una preparación adsorbida sobre un portador, etc.), que sirven para administración parenteral, oral, intravenosa, intramuscular, etc. o para uso externo, pudiendo comprender las composiciones para uso externo aditivos que promuevan la adsorción y difusión de la sustancia activa en tejido.

40 Las composiciones sinérgicas de la presente invención proporcionan la presencia en la composición de otra sustancia activa, en las que el caso de que estén presentes dos sustancias activas al mismo tiempo, uno de las cuales es la AFP según la presente invención, el efecto de su acción es fiablemente mayor que en el caso en que se use cada sustancia separadamente.

45 Resulta bastante obvio que las composiciones sinérgicas son una de las variantes preferidas de realización de la invención, puesto que para un especialista en la materia la variante de administración de cada componente activo separadamente es obvia. Por ejemplo, en el caso de terapia anticancerosa, puede administrarse separada o simultáneamente cada preparación de un componente activo, con separación en el tiempo o con diferentes modos de administración. La selección concreta depende del estado del paciente, la gravedad de la enfermedad, el tratamiento previo, etc.

50 La selección de las dosificaciones terapéuticas para tratamiento puede ser cualquier dosis en un amplio intervalo de 0,001-10 mg/kg del peso del paciente, con la condición de que se obtenga el efecto terapéutico requerido. Corresponde a las dosificaciones tradicionales de AFP humana, puesto que la AFP obtenida tendrá propiedades similares o cercanas con respecto a la actividad. Las dosificaciones limitantes de AFP según la invención

corresponden a dosificaciones de AFP humana, puesto que tienen una secuencia aminoacídica similar que no se reconoce por un sistema inmunitario normal humano como "extraña".

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos, que no son de carácter restrictivo, sino que se pretende que demuestren realizaciones de la invención y prácticas de la mejor variante de la realización.

5 Ejemplo 1

Aislamiento de ARNm total y construcción del plásmido recombinante intermedio de ADN pTrcafp

Se aisló el ARNm total de la línea celular de hepatoma humano HepG2 con la ayuda de reactivo Trizol (Gibco BRL, EE.UU.) de acuerdo con el procedimiento del productor. Se obtuvo el ADNc usando el kit de síntesis de ADNc First Strand (MBI Fermentas) en presencia de cebadores oligo(dT)₁₈ o GAAGTAATTTAAACTCCCAAAGC (3R),
10 complementario del extremo 3' del gen afp. Se llevó a cabo la amplificación de la matriz obtenida para posterior clonación en presencia de los cebadores:

CTTCAATCGATATGACACTGCATAGAAATG (Cla)
CTTCCAAGCTTAAACTCCCAAAGCAG (Hind),

el primero de los cuales corresponde a la secuencia 5' del gen de proteína madura (marcado en negrita) y comprende un sitio de reconocimiento de la restrictasa Cla I, mientras que el segundo es complementario de la sección del extremo 3' del gen (marcado en negrita) y comprende un sitio de reconocimiento de Hind III. Se llevó a cabo la amplificación del gen en un volumen de 100 µl. La mezcla de reacción comprendía 10 ng de ADNc, 30 pM de cada cebador (1) y (2), una mezcla de dNTP (0,2 mM cada uno), Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, KCl 10 mM, MgSO₄ 2,5 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Pfu (compañía Stratagene) y 1 unidad de ADN polimerasa Taq (compañía Fermentas). Se llevaron a cabo 25 ciclos según el esquema: 95°C/40 s, 39°C/40 s, 72°C/1 min. Se analizaron los
20 productos de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%; se cortaron tiras de una longitud de aproximadamente 1790 pb, se extrajo el ADN del gel, se trató con las restrictasas ClaI e Hindi, se clonó en el plásmido pTrcTEGF, obtenido anteriormente basándose en el vector pTrc99A (Amann E., *et al.*, 1988, *Gene*, 69, 301-315), y se trató con esas mismas restrictasas. Como resultado, se obtuvo el plásmido pTrcafp; se confirmó su estructura por análisis de restrictasa usando las restrictasas Cla I e Hind III, respecto a las cuales se llevó a cabo la
25 clonación, y también Spe I, Mun I, Sec I y Sty I, cuyos sitios de reconocimiento están dentro del gen de AFP, y mediante la determinación de la secuencia nucleotídica de la sección de ADN clonada con la ayuda de PCR. Se llevó a cabo al secuenciación según el procedimiento y con el uso del kit secuenciador de ADN Cycle Reader™ (Fermentas, Lituania).

Ejemplo 2

30 *Preparación de ADNc sintético que codifica un gen de AFP humana*

Para obtener un gen de AFP sintetizado, se sintetizaron químicamente 36 oligonucleótidos que tenían una longitud de 62-68 b. Basándose en estos oligonucleótidos, se obtuvieron 6 fragmentos bicatenarios mediante el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa, cada uno de los cuales se clonó en un vector pUC18. Se confirmó la estructura primaria de todos los fragmentos clonados mediante secuenciación. Se recogieron entonces
35 secuencialmente los fragmentos con la estructura nucleotídica correcta en un gen deseado mediante el procedimiento de restricción/ligamiento en forma de un fragmento del plásmido pUC18. Se obtuvo de manera similar un ADNc para la expresión de formas modificadas de AFP, que comprende la delección, mutación o adición de residuos aminoacídicos.

Ejemplo 3

40 *Construcción de un plásmido recombinante de ADN pKX*

Se usó el plásmido pTrcafp como matriz de PCR en presencia de los cebadores:

CAACCCTCGAGTTAAACTCCCAAAGC
CCAACCCATGGCTAAGAGAACACTGCATAGAAA-TG.

Los sitios de restricción de NcoI y XhoI (subrayado) están fijados en la secuencia de los cebadores. El fragmento de ADN obtenido como resultado de la amplificación después del tratamiento con las endonucleasas de restricción
45 NcoI/XhoI se clonó en el vector pUC18/GAL1-pp, que comprende un promotor de GAL1 y la región prepro de secreción de MFα1. Como resultado, se obtuvo el plásmido pUC1B/GAL1-pp/afp. Para excluir posibles errores de PCR, se secuenció el fragmento NcoI/XhoI del plásmido. Se transfirió el fragmento HindIII/XhoI del plásmido pUC18/GAL1-pp/afp, que comprende el promotor de GAL1, la región prepro de secreción de MFα1 y que codifica parte del gen de AFP humano (Fig. 2), al vector pPDX birreplicón de HindIII/XhoI (levadura *E. coli*). Como resultado,
50 se obtuvo el plásmido pPDX/GAL1-pp/afp. Se transfirió el fragmento ClaI/XhoI del plásmido pPDX/GAL1-pp/afp al

vector Clal/XhoI de pPK, que difiere de pPDX por la presencia del gen KAR2. El plásmido obtenido como resultado se denomina pKX (Fig. 1). De manera similar, se obtuvo el plásmido pKX-1, que comprende el gen de AFP humano sintético consistente en los codones de levadura más ampliamente usados (Fig. 3). El plásmido pKX-1 difiere de pKX en que comprende el gen sintético de una AFP humana madura.

5 Ejemplo 4

Obtención de una cepa productora de AFP humana

Para obtener la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX, se transformó la cepa receptora YBS723 por el plásmido pKX de acuerdo con el procedimiento (Ito H., *et al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163-168). Se seleccionaron los transformantes por la capacidad de crecer en medio de levadura completo (bactopeptona - 20 g/l, extracto de levadura - 10 g/l, bactoagar - 20 g/l), que comprende un 2% de glucosa como fuente de carbono. Uno de dichos clones se designa YBS723/pKX.

Ejemplo 5

*Determinación de la productividad de la cepa productora de AFP humana *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX*

Se cultivaron células de la cepa productora YBS723/pKX en viales a 26°C en un agitador (250 rpm) en medio de la siguiente composición: glucosa - 2%, glicerina - 1,5%, extracto de levadura - 1%, peptona - 2%, agua destilada. Se mantuvo el pH del medio a 7,0 mediante la adición de tampón fosfato 0,1 M. La valoración inicial de las células fue de 5×10^6 . Se tomaron muestras después de 72 horas de crecimiento del cultivo después de la transición al estado estacionario de crecimiento a una valoración de $7-8 \times 10^8$. Se obtuvo una muestra del líquido cultivado después de centrifugación del cultivo a 10.000 rpm durante 1 min y se usó en los siguientes análisis. Se analizaron muestras del LC mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% con dodecilsulfato de sodio. Se colorearon los geles con Coomassie R-250 (Fig. 4) y se examinaron para determinar la proteína total y el contenido relativo de la proteína específica AFP. Según los datos de electroforesis y examen, el contenido total de AFP en el LC es de aproximadamente un 10-25% de la proteína total, pero hay una degradación intracelular parcial de la proteína. El contenido relativo de AFP en la LC se determinó mediante el procedimiento de inmunotransferencia en presencia de anticuerpos policlonales de AFP (Fig. 4). Se determinó también el contenido cuantitativo de AFP en el líquido de cultivo mediante el procedimiento de análisis inmunoenzimático (IEA), con el uso de un conjunto de anticuerpos monoclonales y policlonales de AFP humana. Según los datos de IEA, el contenido medio de AFP en el LC en medio líquido alcanza los 5 mg/l.

Ejemplo 6

*Determinación de la productividad de la cepa productora de AFP humana *Saccharomyces cerevisiae* YBS723/pKX en medios de alta densidad*

Se llevó a cabo el cultivo alimentado por lotes de la cepa YBS723/pKX en un fermentador a 26°C y pH 7,0 (mantenimiento automático). Se mantuvo el contenido de oxígeno disuelto $Od > 20\%$. Durante la fermentación, se llevó a cabo el relleno con medio de la siguiente composición: extracto de levadura - 30 g/l, peptona - 60 g/l, glucosa - 100 g/l. La velocidad de alimentación del relleno era tal que proporcionara una velocidad de crecimiento del cultivo $\mu = 0,03$. Después de conseguir una DO_{50} igual a 280 unidades ópticas, se analizó el contenido de AFP en el LC. Se determinó el contenido relativo y total de AFP en el LC de cultivos de alta densidad de YBS723/pKX como se describe anteriormente en el ejemplo 4. En el caso de cultivar en medios de alta densidad, el contenido de AFP en el LC según los datos de IEA alcanzó los 70 mg/l.

40 Ejemplo 7

Aislamiento y caracterización de AFP humana recombinante de LC de una cepa productora YBS723/pKX

El aislamiento de AFP_r del LC de la cepa productora YBS723/pKX se llevó a cabo como se describe anteriormente (Dudich *et al.*, 1999, *Biochemistry*, 38: 10406-10414) con ligeros cambios. Se concentró el líquido de cultivo de 3 l a 200 ml mediante ultrafiltración en una celda concentradora "Millipore" y se dializó frente a un tampón de Tris-HCl 0,005 M, pH 7,5, NaCl 0,1 M, 4°C, y se centrifugó entonces durante 0,5 horas a 10.000 rpm.

Cromatografía de intercambio iónico. Se aplicó el sobrenadante obtenido después de la centrifugación a una columna de intercambio iónico DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, 27 x 4 cm), equilibrada con Tris-HCl 0,01M, pH 7,5, NaCl 0,1 M. Se retiraron los componentes no unidos al adsorbente de la columna por lavado con un tampón de partida, mientras que la elución del producto deseado se llevó a cabo con NaCl 0,2 M en tampón de Tris-HCl, pH 7,5, a una velocidad de 1 ml/min.

Cromatografía de afinidad. Se combinaron las fracciones que comprenden AFP_r, se llevó la concentración de NaCl a 0,5 M y se aplicó a una columna de afinidad con Sepharose CL-4B conjugada con anticuerpos policlonales anti-AFP de conejo, que se equilibró con Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 y NaCl 0,5 M. Después de la salida de las proteínas no unidas a los anticuerpos de las proteínas, se eluyó la AFP_r adsorbida con HCl 0,005 M. Se determinó el pico de la

salida de material tras alcanzar un pH de 5,0 a 3,5 mediante la absorción a 280 nm. Se neutralizó la solución de AFP_r a pH 7,5 mediante la adición de una solución de Tris-HCl 2 M, pH 7,5.

Cromatografía en gel. Se llevó a cabo la purificación adicional de AFP_r mediante cromatografía en gel en una columna con Sephacryl S-200 (1,8 x 70 cm) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0, NaCl 0,15 M, a una velocidad de 0,5 ml/min. Se concentró la solución de AFP_r purificada en una celda "Amicon" (membrana YM-30) a presión de nitrógeno.

Análisis de muestras. Se controlaron la identificación y pureza de la preparación de AFP_r obtenida mediante procedimientos de electroforesis en gel según Lammy en PAGE-SDS al 12,5% con β-mercaptoetanol con posterior coloración con Coomassie (Fig. 4A), análisis de transferencia Western en una membrana de PVDF con una valoración de anticuerpos primarios 1:500 y de anticuerpos secundarios 1:5000, transferencia puntual en una membrana de ECL-nitrocelulosa Hybond (Fig. 4B), e IEA.

Determinación de la concentración de proteína en las soluciones: Se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Bradford, usando una solución estándar de AFP embrionaria como control, y también espectrofotométricamente a 278 nm, teniendo en cuenta un coeficiente de extinción $E_{1\%, 278\text{ nm}} = 0,53$.

Ejemplo 8

Determinación de la actividad biológica de AFP humana recombinante in vitro

Se determinaron la actividad funcional de AFP_r y las formas modificadas de la misma de acuerdo con su capacidad de suprimir el crecimiento de células Raji de linfoma de linfocitos B en el cultivo *in vitro*, como se ha descrito anteriormente (Semenkova L.N., 1997, *Tumor Biol.* 18, 261-274; Dudich E.I., *et al.*, 1998, *Tumor Biol.* 19, 30-40). Se lavaron preliminarmente con un medio reciente, se dispusieron las células Raji en cada celda de una placa de 96 alvéolos a 5×10^3 en 0,1 ml de medio RPMI-1640 en presencia de 10% de suero fetal de ternero y se añadieron entonces diferentes dosis de AFP durante 12 horas. Se midió la proliferación de las células mediante un procedimiento estándar mediante la introducción de [³H]-timidina durante las últimas 4 horas de cultivo. Para comparación, se estudió la reactividad dependiente de la dosis para dos muestras de AFP de origen embrionario, AFP_{embr} y AFP_r de levadura (Fig. 5). Resulta evidente que ambas preparaciones manifiestan una actividad citostática expresada con respecto a estas células. De forma similar, para determinar la actividad de preparaciones basadas en AFP *in vitro*, puede usarse cualquier otra línea de células cancerosas que sean sensibles a la acción supresora de AFP, tales como HepG2 de hepatocarcinoma, MCF-7 de cáncer de mama, LnCap de cáncer de próstata, U-937 de mieloblastoma y otras (Semenkova L.N., 1997, *Tumor Biol.* 18,261-274; Dudich E.I., *et al.*, 1998, *Tumor Biol.* 19, 30-40).

Ejemplo 9

Uso de AFP recombinante como preparación anticancerosa

Las preparaciones anticancerosas basadas en AFP_r y formas modificadas de la misma pueden usarse para la inhibición del crecimiento de neoplasias malignas, tales como cáncer primario o metastásico del hígado, cáncer de sangre (leucemia, mieloblastoma, linfoma), cáncer de mama y cáncer de próstata. Para determinar la sensibilidad de este tipo de células cancerosas a la AFP, es posible usar diferentes procedimientos tanto *in vitro* como *in vivo*. El procedimiento de determinación de la actividad *in vitro* se describe en el ejemplo precedente 8. Para determinar la acción oncosupresora de las preparaciones basadas en AFP *in vivo*, pueden usarse modelos animales, por ejemplo, con el uso de ratones atímicos con líneas celulares humanas de células cancerosas implantadas subcutánea o intraperitonealmente tales como Raji, HepG2, LnCap, MCF-7 y otras. Por ejemplo, se administraron por vía subcutánea células Raji de linfoma de linfocitos B en una cantidad de $1-5 \times 10^6$ por ratón. La administración de AFP y derivadas de la misma se inició 7 días antes del implante de células tumorales por vía intraperitoneal o intravenosa a una cantidad de 1-10 mg/kg. Se usó solución tamponada fisiológica (PBS) como control. Se evaluó el tamaño del tumor mediante medidas diarias con la ayuda de un micrómetro.

Tabla 1

Resultados de ensayos de AFP _r sobre modelos de ratones de línea atímica implantados con células Raji de linfoma de linfocitos B			
Número de animales	Dosis de AFP por inyección	Procedimiento de administración	Resultado
10	1 mg	Intraperitoneal, diariamente durante 20 días	2- Estabilización 5- Inhibición del 50% 3- No se desarrolló tumor

(continuación)

5	PBS	Intraperitoneal, diariamente durante 20 días	10- 100% de desarrollo del tumor
10	0,5 mg	Intraperitoneal, diariamente durante 20 días	2- Estabilización 5- Inhibición del 50% 3- No se desarrolló tumor
10	2 mg	Intraperitoneal, diariamente durante 20 días	2- Estabilización 5- Inhibición del 50% 3- No se desarrolló tumor

El procedimiento de administración de preparaciones basadas en AFP de levadura o derivados de la misma puede comprender también la administración de preparaciones quimioterapéuticas simultánea o secuencialmente. Pueden presentarse como ejemplos de dichas preparaciones quimioterapéuticas las siguientes: doxorubicina, vincristina, fluorouracilo, metotrexato, actinomicina D, mitomicina C, tamoxifeno, flutamida, vincristina, vinblastina, ciclosporina, retinoides, carotenoides y otros. Habitualmente, puede administrarse una preparación quimioterapéutica en dosis estándares o en dosis subóptimas, por debajo de la terapéutica habitual. El efecto de la acción combinada de AFP y doxorubicina (A) y AFP y ácido todo-trans-retinoico (tRA) se presenta como ejemplo en la Fig. 6. En el caso de la administración simultánea de las preparaciones, se observa una acción oncosupresora sinérgica en el caso de uso de dosis subóptimas.

10 Ejemplo 10

Uso de AFP recombinante para la estimulación del crecimiento de citoblastos

Se obtuvo el cultivo primario de fibroblastos embrionarios de pulmón y retina humana tratando con una solución de tripsina al 0,2% los tejidos correspondientes de embriones de 5-10 semanas obtenidos después de abortos legales. Se cultivaron las células en medio RPMI-1640 en presencia de suero fetal bovino (CFS) al 10%. Se midió la actividad citostática de la AFP como se describe anteriormente (Semenkova L.N., 1997, *Tumor Biol.* 18, 261-274; Dudich E.I., *et al.*, 1998, *Tumor Biol.* 19, 30-40). Se lavaron intensivamente células a una cantidad de 4×10^4 en 0,15 ml de medio con un medio reciente, se dispusieron en cada celda de una placa de 96 pocillos, se añadieron entonces diferentes dosis de AFP y se cultivaron durante 24 horas. Se midió la proliferación de células por un procedimiento estándar mediante la inclusión de [3 H]-timidina durante las últimas 4 horas de cultivo.

20 Se estudió también la dependencia de la dosificación del efecto de la AFP sobre el crecimiento celular para el cultivo primario de fibroblastos embrionarios humanos. La AFP tenía efecto un estimulante sobre estas células, alcanzando un 50-90% con respecto al control (Fig. 7).

Ejemplo 11

Uso de AFP recombinante en cosmetología

25 En vista del hecho de que la AFP tiene la capacidad de estimular el crecimiento de citoblastos y de que es un factor de crecimiento para células embrionarias, se propone su posible uso para la preparación de máscaras cosméticas, cremas y lociones. La AFP puede usarse como excipiente para liposomas, microsomas y nanosomas. En vista del hecho de que la AFP es capaz de unirse a ligandos hidrófobos, en particular vitaminas liposolubles, esteroides, isoflavonoides y ácidos grasos poliinsaturados (Deutsch H.F., 1991, *Adv. Canc. Res.* 56, 253-312); Aussel C. y Masseyeff R., 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 1122-1127; Deutsch H.F., 1994, *J. Tumor Marker Oncol.* 9: 11-14), se muestra el uso combinado de AFP con vitaminas liposolubles, tales como derivados de retinoides, carotenoides, tocoferol, vitamina D y esteroides tales como derivados de estrógenos y andrógenos. Pueden usarse también estradiol y otros como ejemplos de dichos esteroides.

Referencias

35 Amann E., Ochs B., Abel K.-J. (1988) "Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*", *Gene*, 69(2): 301-15.

Aussel, C. y Masseyeff, R. (1994) "Interaction of retinoids and bilirubin with the binding of arachidonic acid to human alpha-fetoprotein", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1122-1127.

- Bennett, J. A., Semeniuk, D. J., Jacobson, H. I. y Murgita, R. A. (1997) "Similarity between natural and recombinant human alpha-fetoprotein as inhibitors of estrogen-dependent breast cancer growth". Breast Cancer Res. Treat. 45, 169-179.
- 5 Bennet, J. A., Zhu, S., Pagano-Mirarchi, A., Kellom, T. A. y Jacobson, H. I. (1998) "α-Fetoprotein derived from a human hepatoma prevents growth of estrogen-dependent human breast cancer xenografts". Clinical Cancer Research, 4, 2877-2884.
- Boismenu R., Semeniuk D., Murgita R.A. (1997) "Purification and characterization of human and mouse recombinant alpha-fetoproteins expressed in Echerichia coli". Protein Expression and Purification. 10: 10-26.
- 10 Chung B.H., Park K.S. (1998) A simple approach to reducing the proteolysis during the secretory production of human parathyroid hormone in Saccharomyces cerevisiae". Biotechnol. Bioeng. 57: 245-249.
- Deutsch, H.F. (1991) "Chemistry and biology of α-fetoprotein". Adv. Canc. Res. 56, 253-312.
- Deutsch H.F. (1994) "The uptake of adriamycin-arachidonic acid complexes by human tumor cells in the presence of α-fetoprotein". J. Tumor Marker Oncol. 9: 11-14.
- 15 Dudich, E. I., Semenkova, L. N., Gorbatova, E. A., Dudich, I. V., Khromykh, L. M., Tatulov, E. B., Grechko, G. K. y Sukhikh, G. T. (1998) "Growth-regulative activity of alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells". Tumor Biol. 19, 30-40.
- Dudich E.I., Semenkova L.N., Dudich I.V., Gorbatova E.A., Tokhtamysheva, N., Tatulov E.B., Nikolaeva M.A. y Sukhikh G.T. (1999) "α-Fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases". Eur. J. Biochem., 266: 1-13.
- 20 Dudich, I.V., Tokhtamysheva, N., Semenkova, L., Dudich, E., Hellman, J. y Korpela, T. (1999) "Isolation and structural and functional characterization of two stable peptic fragments of human alpha-fetoprotein". Biochemistry, 38: 10406-10414.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. (1983) "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations". J. Bacteriol. 1983, 153: 163-168.
- 25 Hard K, Bitter W, Kamerling JP, Vliegenthart JF. (1989) "O-mannosylation of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I) produced in Saccharomyces cerevisiae". FEBS Lett. 248: 111-4.
- Quirk A.Y., Geisow M.J., Woodrow J.R., Burton S.J., Wood P.C., Sutton A.D., Lohson R.A., Dodsworth N. (1989) "Production of recombinant human serum albumin from Saccharomyces cerevisiae". Biotechnol. Appl. Biochem. 11: 273-287.
- 30 Kang H.A., Choi E.S., Hong W.K., Kim J.Y., Ko S.M., Sohn J.H., Rhee S.K. (2000) "Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast Saccharomyces cerevisiae". Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 575-582.
- Mizejewsky G.J. (2002) "Biological role of α-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy". Expert Rev. Anticancer. Ther. 2: 89-115.
- 35 Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T.G. y Namaoki, T. (1983) "Primary structures of human α-fetoprotein and its mRNA". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4604-4608.
- Murgita R., "Recombinant human alpha-fetoprotein as an immunosuppressive agent", patente de EE.UU. 5.965.528 C07K 14/47, 1999.
- 40 Murgita R., "Recombinant human alpha-fetoprotein as a cell proliferative agent", patente de EE.UU. 6.627.440 C12N 005/00, 2003.
- Murgita R., "Recombinant alpha-fetoprotein for treating and diagnosing cancers", 6.416.734, A61K 051/00, 2002.
- Murgita R. A. "Expression and purification of cloned human alpha-fetoprotein", patente de EE.UU. 6.331.611 C07K 014/00,2001.
- 45 Nishi S., Koyama Y., Sakamoto T., Soda M., Kairiyama C.B. (1988) "Expression of rat α-fetoprotein cDNA Esherichia coli and in yeast". J. Biochem. 104: 968-972.
- Pucci, P., Siciliano, R., Malorni, A., Marino, G., Tecce, M., F., Ceccarini, C. y Terrana, B. (1991) Biochemistry 30: 5061-5066.

Uriel J., Laborda J., Naval J., Geuskens M. (1989) "Alpha-fetoprotein receptors in malignant cells. An overview"; en Mizejewsky G.I., Jakobson H.I. (eds): "Biological Properties of Alpha-Fetoprotein". Boca Raton, CRC Press, vol. 2: 103-117.

5 Robinson A.S., Bockhaus J.A., Wittrup K.D. (1996) "Reduction of BiP level decreases heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol. Chem. 271: 10017-10022.

Semenkova, L. N., Dudich, E. I. y Dudich, I. V. (1997) "Induction of apoptosis in human hepatoma cells by alphafetoprotein". Tumor Biol. 18, 261-274.

10 Semenkova, L., Dudich, E., Dudich, I., Tokhtamisheva, N., Tatulov, E., Okruzhnov, Y., Garcia-Foncillas, J., Palop-Cubillo J.-A., Korpela T. (2003) "Alpha-fetoprotein positively regulates cytochrome c-mediated caspase activation and apoptosome complex formation", Eur. J. Biochem. 70: 4388-4399.

Sleep D., Belfield G.P., Goodey A.R. (1990) "The secretion of human serum albumin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences". Biotechnology 8: 42-46.

Shusta E.V., Raines R.T., Pluckthun A., Wittrup K.D. (1998) "Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragment". Nature Biotechnol. 16: 773-777.

15 Tamaoki T., Morinaga T., Nishi S. (1993) "Method of producing human alpha-fetoprotein and product produced thereby", patente de EE.UU. 5.206.153, C07K 013/00; C12N 015/62.

Tsukada Y., Hibi N., Ohkawa K., Deutsch H.F. (1994) "Cytocidal effect of daunomycin unsaturated fatty acid complexes on rat tumor cell lines". J. Tumor Marker Oncol. 9: 99-103.

20 Yamashita, K., Taketa, K., Nishi, S., Fukushima K. y Ohkura T. (1993) "Sugar chains of human cord serum α -fetoprotein". Cancer Res. 53, 2970-2975.

Yamamoto R., Sakamoto T., Nishi S., Sakai M., Morinaga T., Tamaoki T. (1990) "Expression of human α -fetoprotein in yeast". Life Sciences, 46:1679-1686.

Listado de secuencias

25 <110> BENEVOLENSKY, Sergei Bladimirovich; MARCHENKO, Alexei Nikolaevich; KOZLOV, Dmitry Georgievich; ZATSEPIN, Sergei Sergeevich; SHINGAROVA, Lyudmila Nikolaevna; DUDICH, Igor Vyacheslavovich; SEMENKOVA, Lidiya Nikolaevna; DUDICH, Dmitry Igorevich; TATULOV, Eduard Borisovich; DUDICH, Elena Ivanovna

<120> ALFA-FETOPROTEÍNA RECOMBINANTE, PROCEDIMIENTO Y MEDIO PARA LA PREPARACIÓN DE LA MISMA, COMPOSICIONES BASADAS EN LA MISMA Y USO DE LA MISMA

30 <160> 2

<210> 1

<211> 2556

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <400> 1

ES 2 384 863 T3

aagcttttagc	ctaaaaaaaaac	cttctctttg	gaactttcag	taatacgctt	aactgctcat	60
tgctatattg	aagtacggat	tagaagccgc	cgagcgggtg	acagccctcc	gaaggaagac	120
tctcctccgt	gogtccctgt	cttcaccggt	cgcgttcctg	aaacgcagat	gtgcctcgcg	180
ccgcactgct	ccgaacaata	aagattctac	aatactagct	tttatggta	tgaagaggaa	240
aaattggcag	taacctggcc	ccacaaacct	tcaaatgaac	gaatcaaatt	aacaaccata	300
ggatgataat	gcgattagtt	ttttagcctt	atttctgggg	taattaatca	gogaagcgat	360
gatttttgat	ctattaacag	atatataaat	gcaaaaactg	cataaccact	ttaactaata	420
ctttcaacat	tttcggtttg	tattacttct	tattcaaatg	taataaaaagt	atcaacaaaa	480
aattgttaat	atacctctat	actttaacgt	caaggagaaa	aaactaccat	gagatttcca	540
tctatcttca	ctgcagtttt	attcgcagca	tcctccgcat	tagctgctcc	agtcaacact	600
acaacagaag	atgaaacggc	acaaattccg	gctgaagctg	tcctcgggta	cttagattta	660
gaaggggatt	tcgatgttgc	tgttttgcc	ttttccaaca	gcacaaataa	cgggttattg	720
tttataaata	ctactattgc	cagcattgct	gctaaagaag	aaggggtatc	catggctaaa	780
aggacactgc	atagaaatga	atatggaata	gcttccatat	tggattctta	ccaatgtact	840
gcagagataa	gttttagctga	cctggctacc	atattttttg	cccagtttgt	tcaagaagcc	900
acttacaagg	aagtaagcaa	aatggtgaaa	gatgcattga	ctgcaattga	gaaaccctct	960
ggagatgaac	agtcttcagg	gtgttttagaa	aaccagctac	ctgcctttct	ggaagaactt	1020
tgccatgaga	aagaaatfff	ggagaagtac	ggacattcag	actgctgcag	ccaaagtgaa	1080
gaggggaagac	ataactgttt	tcttgccacac	aaaaagcca	ctccagcatc	gatcccactt	1140
ttccaagttc	cagaacctgt	cacaagctgt	gaagcatatg	agaagacag	ggagacattc	1200
atgaacaaat	tcatttatga	gatagcaaga	aggcatccct	tcctgtatgc	acctacaatt	1260
cttctttggg	ctgctcgcta	tgacaaaata	attccatctt	gctgcaaagc	tgaaaatgca	1320
ttgaatgct	tccaaacaaa	ggcagcaaca	gttacaaaag	aattaagaga	aagcactttg	1380
ttaaatcaac	atgcatgtgc	agtaatgaaa	aatftttggga	cccgaacttt	ccaagccata	1440
actgttacta	aactgagtca	gaagtttacc	aaagtttaatt	ttactgaaat	ccagaaacta	1500
gtcctgggatg	tggcccatgt	acatgagcac	tgttgcagag	gagatgtgct	ggattgtctg	1560
caggatgggg	aaaaaatcat	gtcctacata	tgttctcaac	aagacactct	gtcaaacaaa	1620
ataacagaat	gctgcaaact	gaccacgctg	gaacgtggtc	aatgtataat	tcatgcagaa	1680
aatgatgaaa	aacctgaagg	tctatctcca	aatctaaaca	ggtttttagg	agatagagat	1740
tttaaccaat	tttcttcagg	ggaaaaaaat	atcttcttgg	caagttttgt	tcatgaatat	1800
tcaagaagac	atcctcagct	tgctgtctca	gtaattctaa	gagttgctaa	aggataccag	1860
gagttattgg	agaagtgttt	ccagactgaa	aaccctcttg	aatgccaaga	taaaggagaa	1920
gaagaattac	agaaatacat	ccaggagagc	caagcattgg	caaagcgaag	ctgcggcctc	1980
ttccagaaac	taggagaata	ttacttacia	aatgcgtttc	tcgttgctta	cacaaagaaa	2040
gccccccagc	tgacctcgtc	ggagctgatg	gccatcacca	gaaaaatggc	agccacagca	2100
gccacttggt	gccaaactcag	tgaggacaaa	ctattggcct	gtggcgaggg	agcggctgac	2160
attattatcg	gacacttatg	tatcagacat	gaaatgactc	cagtaaacc	tggtgttggc	2220
cagtgtgca	cttcttcata	tgccaacagg	aggccatgct	tcagcagctt	ggtggtggat	2280
gaaacatatg	tcctcctcgc	attctctgat	gacaagttca	ttttccataa	ggatctgtgc	2340
caagctcagg	gtgtagcgct	gcaaacgatg	aagcaagagt	ttctcattaa	ccttgtgaag	2401
caaaagccac	aaataacaga	ggaacaactt	gaggctgtca	ttgcagattt	ctcaggcctg	2460
ttggagaaat	gctgccaagg	ccaggaacag	gaagtctgct	ttgctgaaga	gggacaaaaa	2520
ctgatttcaa	aaactcgtgc	tgctttggga	gtttaa			2556

<210> 2

<211> 590

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 384 863 T3

Thr	Leu	His	Arg	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ser	Ile	Leu	Asp	Ser	Tyr
1				5					10					15	
Gln	Cys	Thr	Ala	Glu	Ile	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Ala	Thr	Ile	Phe	Phe
			20					25					30		
Ala	Gln	Phe	Val	Gln	Glu	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Val	Ser	Lys	Met	Val
		35					40					45			
Lys	Asp	Ala	Leu	Thr	Ala	Ile	Glu	Lys	Pro	Thr	Gly	Asp	Glu	Gln	Ser
	50					55					60				
Ser	Gly	Cys	Leu	Glu	Asn	Gln	Leu	Pro	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Cys
65					70					75					80
His	Glu	Lys	Glu	Ile	Leu	Glu	Lys	Tyr	Gly	His	Ser	Asp	Cys	Cys	Ser
				85					90					95	
Gln	Ser	Glu	Glu	Gly	Arg	His	Asn	Cys	Phe	Leu	Ala	His	Lys	Lys	Pro
			100					105					110		
Thr	Pro	Ala	Ser	Ile	Pro	Leu	Phe	Gln	Val	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Ser
		115					120						125		
Cys	Glu	Ala	Tyr	Glu	Glu	Asp	Arg	Glu	Thr	Phe	Met	Asn	Lys	Phe	Ile
	130					135					140				
Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ala	Pro	Thr	Ile	Leu
145					150					155					160
Leu	Trp	Ala	Ala	Arg	Tyr	Asp	Lys	Ile	Ile	Pro	Ser	Cys	Cys	Lys	Ala
				165					170					175	
Glu	Asn	Ala	Val	Glu	Cys	Phe	Gln	Thr	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Lys
			180					185					190		
Glu	Leu	Arg	Glu	Ser	Ser	Leu	Leu	Asn	Gln	His	Ala	Cys	Ala	Val	Met
		195						200				205			
Lys	Asn	Phe	Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Gln	Ala	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Leu
	210					215					220				
Ser	Gln	Lys	Phe	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Thr	Glu	Ile	Gln	Lys	Leu	Val
225					230					235					240
Leu	Asp	Val	Ala	His	Val	His	Glu	His	Cys	Cys	Arg	Gly	Asp	Val	Leu
				245					250					255	
Asp	Cys	Leu	Gln	Asp	Gly	Glu	Lys	Ile	Met	Ser	Tyr	Ile	Cys	Ser	Gln
			260					265					270		
Gln	Asp	Thr	Leu	Ser	Asn	Lys	Ile	Thr	Glu	Cys	Cys	Lys	Leu	Thr	Thr
		275					280						285		
Leu	Glu	Arg	Gly	Gln	Cys	Ile	Ile	His	Ala	Glu	Asn	Asp	Glu	Lys	Pro
	290					295					300				
Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Asn	Leu	Asn	Arg	Phe	Leu	Gly	Asp	Arg	Asp	Phe
305					310					315					320
Asn	Gln	Phe	Ser	Ser	Gly	Glu	Lys	Asn	Ile	Phe	Leu	Ala	Ser	Phe	Val
				325					330					335	
His	Glu	Tyr	Ser	Arg	Arg	His	Pro	Gln	Leu	Ala	Val	Ser	Val	Ile	Leu
			340					345					350		
Arg	Val	Ala	Lys	Gly	Tyr	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Lys	Cys	Phe	Gln	Thr
		355					360						365		
Glu	Asn	Pro	Leu	Glu	Cys	Gln	Asp	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Leu	Gln	Lys
	370					375						380			
Tyr	Ile	Gln	Glu	Ser	Gln	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Ser	Cys	Gly	Leu	Phe
385					390					395					400

Gln	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Gln	Asn	Ala	Phe	Leu	Val	Ala	Tyr
				405					410					415	
Thr	Lys	Lys	Ala	Pro	Gln	Leu	Thr	Ser	Ser	Glu	Leu	Met	Ala	Ile	Thr
			420					425					430		
Arg	Lys	Met	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Cys	Cys	Gln	Leu	Ser	Glu	Asp
		435				440						445			
Lys	Leu	Leu	Ala	Cys	Gly	Glu	Gly	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile	Ile	Gly	His
	450					455					460				
Leu	Cys	Ile	Arg	His	Glu	Met	Thr	Pro	Val	Asn	Pro	Gly	Val	Gly	Gln
465					470					475					480
Cys	Cys	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ser	Leu
			485					490						495	
Val	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Asp	Asp	Lys	Phe
			500				505						510		
Ile	Phe	His	Lys	Asp	Leu	Cys	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Ala	Leu	Gln	Thr
		515					520					525			
Met	Lys	Gln	Glu	Phe	Leu	Ile	Asn	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gln	Ile
	530					535					540				
Thr	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Ile	Ala	Asp	Phe	Ser	Gly	Leu	Leu
545					550					555					560
Glu	Lys	Cys	Cys	Gln	Gly	Gln	Glu	Gln	Glu	Val	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu
				565					570					575	
Gly	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Lys	Thr	Arg	Ala	Ala	Leu	Gly	Val		
			580					585					590		

REIVINDICACIONES

1. Un plásmido pKX recombinante que comprende: un módulo de expresión de SEQ ID NO:1 que codifica una alfa-fetoproteína humana madura (SEQ ID NO: 2), un fragmento del plásmido bacteriano pUC18, una región de inicio de la replicación de un plásmido de levadura de 2 µm, un gen KAR2 que proporciona el correcto ensamblado de la proteína y la secreción del producto deseado a un medio de cultivo, un gen PDI1 que proporciona la correcta formación de enlaces disulfuro, un marcador de levadura URA3 selectivo y PGK1 selectivo.
2. Una célula productora eucariótica que tiene la capacidad de secretar alfa-fetoproteína recombinante humana transformándola con el plásmido pKX según la reivindicación 1.
3. Un procedimiento para la preparación de una alfa-fetoproteína recombinante (SEQ ID NO: 2) que comprende: cultivar una célula eucariótica según la reivindicación 2, teniendo la célula la capacidad de secretar una alfa-fetoproteína recombinante al medio de cultivo, y la etapa de aislar la alfa-fetoproteína recombinante a partir del medio de cultivo.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la célula eucariótica es una célula de levadura.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de 23-33°C en un medio que comprende: glucosa - 2%, glicerina – 1,5%, extracto de levadura - 1%, peptona - 2%, agua destilada, con el mantenimiento del pH del medio a 4,5-7,0 mediante tamponación adicional y añadiendo oxígeno soluble hasta pO₂ > 20%.

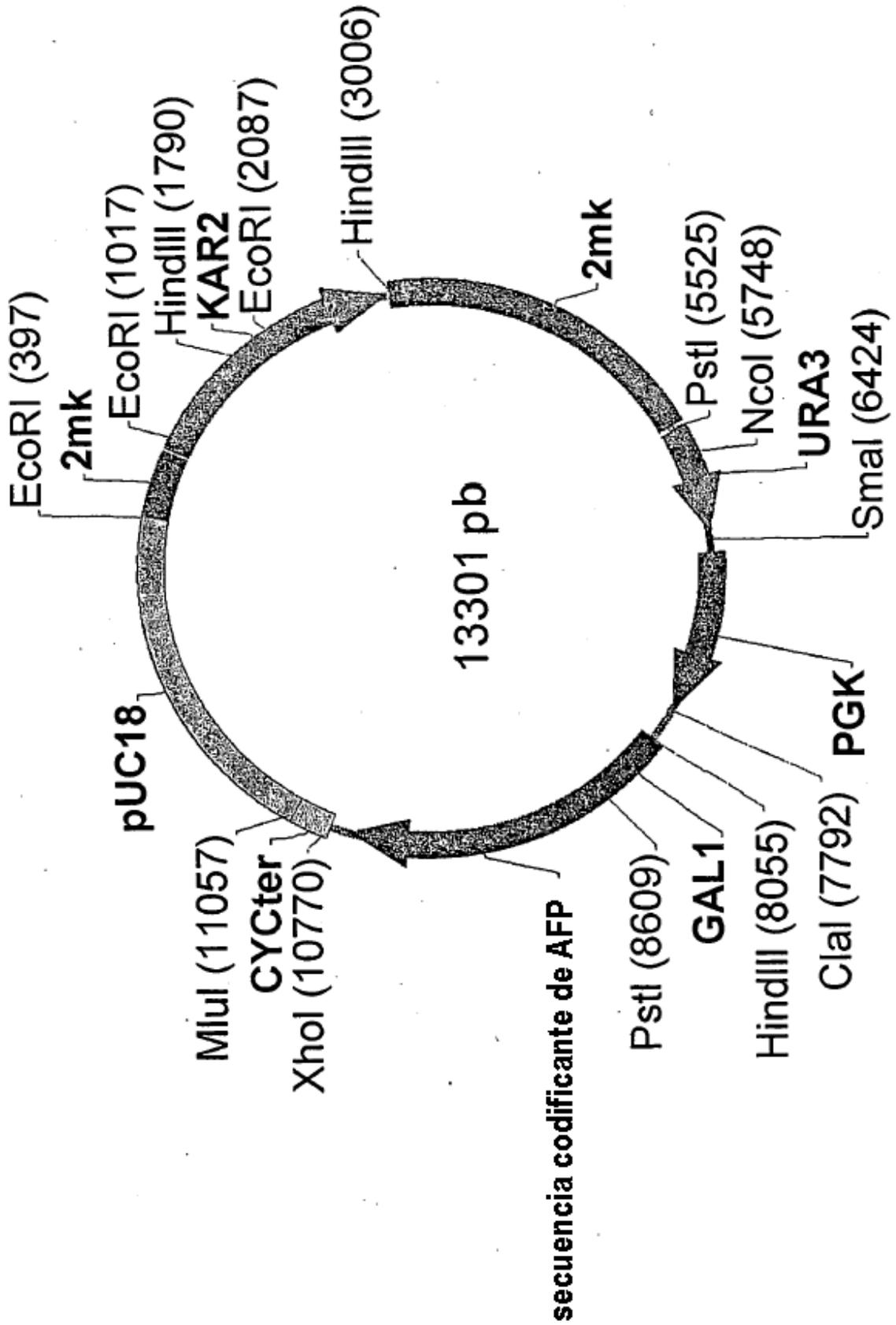


FIG.1


```

481 491 501 511 521 531 541
aatgttaatacctctatactttaacgtcaaggagaaaaaactaccatgagattcca
M R F P 4
. . . . . ^BsaBI .
541 551 561 571 581 591 601
S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T 24
tctatctcactgcagttttattcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacact
. . . . . ^PstI .
601 611 621 631 641 651 661
T T E D E T A Q I P A E A V I G Y L D L 44
acaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgtcatcggttacttagattta
. . . . . 701 711 721
E G D F D V A V L P F S N S T N G L L 64
gaagggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaataacgggttattg
. . . . . 751 761 771 781
F I N T T I A S I A A K E E G V S M A K 84
ttataataactactatttgccagcattgctgctaaagaagggtatccatggctaaa
. . . . . ^NcoI. .
781 791 801 811 821 831 841
R T L H R N E Y G I A S I L D S Y Q C T 104
aggacactgcatagaaatggaatagcttccatattggatttccaatgtact
. . . . . ^PstI

```

FIG.2b

```

841 851 861 871 881 891 901
A I S L A D L A T I F F A Q F V Q E A 124
gcagagataagtttagctgacctggctaccatatttttggcccagtttgttcaagaagcc
.
901 911 921 931 941 951 961
T Y K E V S K M V K D A L T A I E K P T 144
actacaaggaagtaagcaaatggtgaagatgcattgactgcaattgagaaccact
.
. . . ^AvaII . . ^MfeI . .
961 971 981 991 1001 1011 1021
G D E Q S S G C L E N Q L P A F L E E L 164
ggatgaacagtcttcagggtgttagaaaaccagctacctgcctttctggaagaactt
.
.
1021 1031 1041 1051 1061 1071 1081
C H E K E I L E K Y G H S D C S Q S E 184
tgccatgagaaagaattttggagaagtacggacattcagactgctgcagccaaagtgaa
.
. . . ^PstI. .
1081 1091 1101 1111 1121 1131 1141
E G R H N C F L A H K K P T P A S I P L 204
gaggaagacataactgttttcttgacacaaaagccactccagcatcgatcccactt
.
. . . ^ClaI .
. . . ^Sau3A .
1141 1151 1161 1171 1181 1191 1201
F Q V P E P V T S C E A Y E E D R E T F 224
ttccaagttccagaacctgtcacaaagctgtgaagcatatgaagaagacagggagacattc
.
. . . ^NdeI. . ^BspHI

```

FIG.2c

```

1201 1211 1221 1231 1241 1251 1261
M N K F I Y E I A R R H P F L Y A P T I 244
atgaacaattcatttatgagatagcaagaaggcattcccttccctgtatgacacctacaatt
.
1261 1271 1281 1291 1301 1311 1321
L L W A A R Y D K I I P S C C K A E N A 264
cttctttgggtcgtctatgacaaaataattccatcttctgctcaaaagctgaaaatgca
.
1321 1331 1341 1351 1361 1371 1381
V E C F Q T K A A T V T K E L R E S S L 284
gttgaatgcttccaaaaggcagcaacagttacaaaagaattaagagaagcagcttg
.
1381 1391 1401 1411 1421 1431 1441
L N Q H A C A V M K N F G T R T F Q A I 304
ttaaacaacatgcatgtgcagtaatgaaaaattttggaccgccaaactttccaagccata
.
1441 1451 1461 1471 1481 1491 1501
T V T K L S Q K F T K V N F T E I Q K L 324
actgttaactaaactgagtcagaagtttaccaaaagtttaatttactgaaatccagaaacta
.
1501 1511 1521 1531 1541 1551 1561
V L D V A H V H E H C C R G D V L D C L 344
gtcctggatgtggcccatgtacatgagcactgttgcagaggagatgtgctggattgtctg
.
1561 1571 1581 1591 1601 1611 1621
^BspI407I ^PstI

```

FIG.2d

```

Q D G E K I M S Y I C S Q Q D T L S N K 364
caggatgggaaaaaatcatgtcctacatatgttctcaacaagacactctgtcaaaacaaa
. 1621 1631 1641 1651 1661 1671 1681
I T E C C K L T T L E R G Q C I I H A E 384
atacagaatgctgcaaaactgaccacgctggaacgtggtcaatgtataatcatgcagaa
. 1681 1691 1701 1711 1721 1731 1741
N D E K P E G L S P N L N R F L G D R D 404
aatgatgaaaaacctgaaggtctatctccaaatctaaacagggttttaggagatagagat
. 1741 1751 1761 1771 1781 1791 1801
F N Q F S S G E K N I F L A S F V H E Y 424
tttaaccaatttcttcaggggaaaaaataatctcttcttggcaagttttgttcatgaatat
. . . . . ^BspHI .
. . . . . ^SspI 1861
1801 1811 1821 1831 1841 1851
S R R H P Q L A V S V I L R V A K G Y Q 444
tcaagaagacatcctcagcttgctgtctcagtaattcttaagagttgctaaaggataccag
. . . ^Bpu10I. .
1861 1871 1881 1891 1901 1911 1921
E L L E K C F Q T E N P L E C Q D K G E 464
gagttattggagaagtgttccagactgaaaacctcttgaatgccaagataaaggagaa
. . . . .
1921 1931 1941 1951 1961 1971 1981
E E L Q K Y I Q E S Q A L A K R S C G L 484
gaagaattacagaaatacatccaggagagcccaagcattggcaaaagggaagctgcggcctc
. . . . .

```

FIG.2e

```

1981 1991 2001 2011 2021 2031 2041
F Q K L G E Y Y L Q N A F L V A Y T K K
ttcagaactaggagaatattacttacaaaatgcgtttctcgttgcttacacaagaagaaa
      ^SspI
2041 2051 2061 2071 2081 2091 2101
A P Q L T S S E L M A I T R K M A A T A
gccccagctgacctcgtcggagctgatggccatcaccaagaaaatggcagccacagca
      ^PvuII      ^BsaBI
      ^Bali
2101 2111 2121 2131 2141 2151 2161
A T C C Q L S E D K L L A C G E G A A D
gccacttgccaactcagtgaggacaactattggcctgtggcagggagcggctgac
      ^BsrBI
2161 2171 2181 2191 2201 2211 2221
I I I G H L C I R H E M T P V N P G V G
attattatcggacacttattgtatcagacatgaatgactccagtaaacctggtgtggc
      ^Bali
2221 2231 2241 2251 2261 2271 2281
Q C C T S S Y A N R R P C F S S L V V D
cagtgctcacttctcatatgccaaacaggagccatgcttcagcagcttgggtggat
      ^NdeI
2281 2291 2301 2311 2321 2331 2341
E T Y V P P A F S D D K K F I F H K D L C

```

FIG.2f

```

gaaacatatgtccctcctgcattctctgatgacaagttcattttccataaaggatctgtgc
. ^NdeI. . . . . ^Sau3A . . . . .
2341 2351 2361 2371 2381 2391 2401
Q A Q G V A L Q T M K Q E F L I N L V K 624
caagtcagggtgtagcgctgcaaacgatgaagcaagagtttctcattaaccttgtgaag
. ^Bpu10I ^Eco47III . . . . .
2401 2411 2421 2431 2441 2451 2461
Q K P Q I T E E Q L E A V I A D F S G L 644
caaagccacaataacagaggaacaacttgaggctgctcattgcagatttctcaggcctg
. ^StuI . . . . .
2461 2471 2481 2491 2501 2511 2521
L E K C C Q G Q E Q E V C F A E E G Q K 664
ttggagaaatgctgccaggccaggaaacaggaagtctgctttgctgaagaggacaaaaa
. . . . .
2521 2531 2541 2551
L I S K T R A A L G V &
ctgatttcaaaaactcgtgctgcttgggagtttaa

```

FIG.2g

FIG.3a

```

1  M A K G T L H R N E Y G I A S I L D S Y 20
   atggc taaaggtaaccttgcatagaaatgaatatggattgcttctattttggatttcttat
   taccg atttccatggaaacgtatcttacttataccataacgaagataaaaacctaagaata
   ^NcoI ^KpnI ^BsaBI
61  Q C T A E I S L A D L A T I F F A Q F V 40
   caatgtagctgaaatttcttggctgattggctactatttttttggctcaatttggtt
   gttacatgacgactttaagaaccgactaaaccgatgataaaaaaacgagttaaaciaa
121  Q E A T Y K E V S K M V K D A L T A I E 60
   caagaagctactataaagaagtttctaataatggttaagaatgctttgactgctattgaa
   gttcttcgatgaataatttctcaagattttaccaatttctacgaaactgacgataaact
181  K P T G D E Q S S G C L E N Q L P A F L 80
   aaaccaactggtgatgaacaatcttctggttgttggaaaaatcaattgccagcttttttg
   tttggtgaccactacttgttagaagaccaacaacaccttttagttaacggtcgaaaaaac
   ^MfeI
241  E E L C H E K E I L E K Y G H S D C C S 100
   gaagaattggtcatgaaaaagaattttggaaaaaatatggtcattctgattggttctct
   cttcttaacacagtagtcttctttaaacccttttataccagtaagactaacaacaaga
   ^BspHI
301  Q S E E G R H N C F L A H K K P T P A S 120
   caatctgaagaaggtagacataaattggttttggctcataaaaaaaccaactccagcttct
   gttagacttcttccatctctgtatttaacaacaaaccgagtaatttttgggttgaggtcgaaga

```

```

361      371      381      391      401      411      421
I P L F Q V P E P V T S C E A Y E E D R 140
attccattgttcaagttccagaaccagttacatcttgtgaagcatalatgaagaagataga
taaggtaacaagaagttcaaggcttggtaatgtagaacacttcgtatatacttcttctatct
.
421      431      441      451      461      471      481
E T F M N K F I Y E I A R R H P F L Y A 160
naaactttatgaataaatttatttatgaattgctagaagacatccatttttggtagct
ctttgaaaataacttatttaaaaataactttaacgatcttctgtaggtaaaaacatacga
.
491      501      511      521      531      541
P T I L L W A A R Y D K I I P S C C K A 180
caactatttgtgtggctgtagatatgataaaattattccatcttgttgttaagct
gttgataaaaacaacccgacgatctatactattttaataaggtagaacacaacatttcga
.
541      551      561      571      581      591      601
E N A V E C F Q T K A A T V T K E L R E 200
gaaaatgctgtgaatgtttcaactaaagctgctactgttactaaagaattgagagaa
cttttacgacaacttacaagaattgtatttcgacgatgacaatgatttcttaactcttt
.
601      611      621      631      641      651      661
S S L L N Q H A C A V M K N F G T R T F 220
tcttcttgttgaatcaacacgcgatgctgttatagaaaaattttggtactagaactttt

```

FIG.3b

```

agaagaaacttagttgtgcgtacgcgacaataacttttaaaaccatgatccttgaaaa
661 671 681 691 701 711 721
Q A I T V T X L S Q K F T K V N F T E I
caagctattactgttaactaaattgtctcaaaaattactaaagtttaatttactgaaatt
gttcgataatgacaatgatttaaacagagtttttaaatgatttcaattaaaatgactttaa
721 731 741 751 761 771 781
Q K L V L D V A H V H E H C C R G D V L
caaaaattgggtttggatgtgctcatgttcatgaacattgtttagagggtgatgttttg
gttttaaccaaaacctacaacgagtagtaacttgttaacaacatctccactacaaaac
^BspHI
781 791 801 811 821 831 841
D C L Q D G E K I M S Y I C S Q Q D T L
gattgttgcagatggtgaaaaaattatgtcttataattgttctcaacaagatactttg
ctaacaacgttctaccacttttttaatacagaataataacaagagttgttctatgaaac
841 851 861 871 881 891 901
S N K I T E C C K L T T L E R G Q C I I
tctaataaaattactgaatgttgaataattgactacttttgaaagagggtcaatgcattatt
agattattttaatgacttacaacatttaactgatgaaaccttctccagttacgtaataa
^AvaIII
901 911 921 931 941 951 961
H A E N D E K P E G L S P N L N R F L G
catgctgaaaatgatgaaaaaccagaaggttgtctccaatttgaatagatttttgggt
gtacgacttttactacttttgggtcttccaacacagaggtttaaacttatctaaaaaccca

```

FIG.3C

FIG.3d

```

961 971 981 991 1001 1011 1021
D R D F N Q F S S G E K N I F L A S F V 340
gatagattttaatcaatttcttctggtgaaaaaataatttttggcttcttggtt
ctatctctaaaaattagttaaaaagaagaccactttttataaaaaaacccgaagaaaaaaa
^BsaBI . . . ^SspI . . . ^BspHI
.
1021 1031 1041 1051 1061 1071 1081
H E Y S R R H P Q L A V S V I L R V A K 360
catgaatattctagaagacatccacaattagctgttctgttattttgagagttgctaaa
gtactataagatcttctgtaggttaatcgacaagaacaataaaaactctcaacgattt
^SspI. . . . .
.
^XbaI . . . . .
1081 1091 1101 1111 1121 1131 1141
G Y Q E L L E K C F Q T E N P L E C Q D 380
ggttatcaagaattgttgaaaaaatgttttcaaaactgaaaaatccattggaatgtcaagat
ccaatagttcttaacaacctttttacaaaagttagcttttaggtaaccttacagttcta
.
.
1141 1151 1161 1171 1181 1191 1201
K G E E E L Q K Y I Q E S Q A L A K R S 400
aaaggtgaagaagaattgcaaaaatataattcaagaatctcaagcattggctaaaagatcc
ttccacttcttcttaacggtttttatataaagtcttcttagagttcgttaaccgatttctaga
.
.
^BglII . . .
.
^Sau3A . . .
1201 1211 1221 1231 1241 1251 1261
C G L F Q K L G E Y Y L Q N A F L V A Y 420
tgggttcttcaaaaaattgggtgaatattatttgcaaaaatgcttttttgggtgcttat
acaccaaacaaagtttttaaccacttataataaacgttttacgaaaaaaccaacgaata

```



```

1561 1571 1581 1591 1601 1611 1621
D L C Q A Q G V A L Q T M K Q E F L I N 540
gatttgtcaagctcaagggtgttgcttgcacaactatgaacaagaattcttgattaat
ctaaacacagttcgagttccacaacgaaacggttgatacttcttaagaactaatta
. . . ^EcoRI ^VspI.

1621 1631 1641 1651 1661 1671 1681
L V K Q K P Q I T E E Q L E A V I A D F 560
:tggttaaacaaaaccacaattactgaagaacaattagaagctgttattgctgatttt
aaccaatttgttttgggtttaaataatgacttcttggtaatacttcgacaataacgactaaaa
. . .

1681 1691 1701 1711 1721 1731 1741
S G L L E K C C Q G Q E Q E V C F A E E 580
:ctggtttgggaaaaatgttgcagggtcaagaacaagaagtttggtttgcctgaagaa
agaccaaaacaccttttacaacagttccagttcttcttcaaaaacgacttctt
. . .

1741 1751 1761 1771 1781 1791
G Q K L I S K T R A A L G V & L E 597
ggtcaaaaattgatttctaactagagctgcttgggtgtttaaactcgagatat
ccagttttaaactaaagattttgatctcgacgaaaccacaattgagctctata
. . . ^XhoI

```

FIG.3f

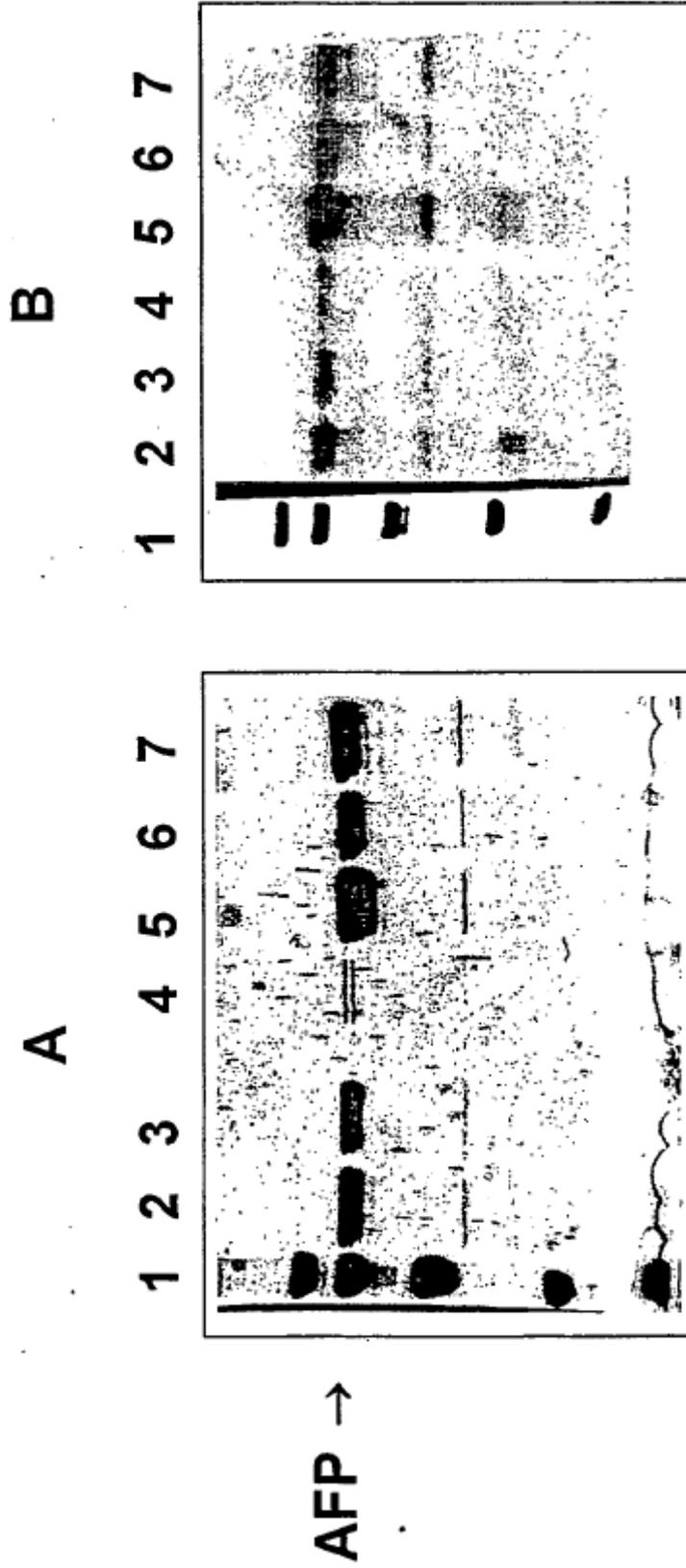
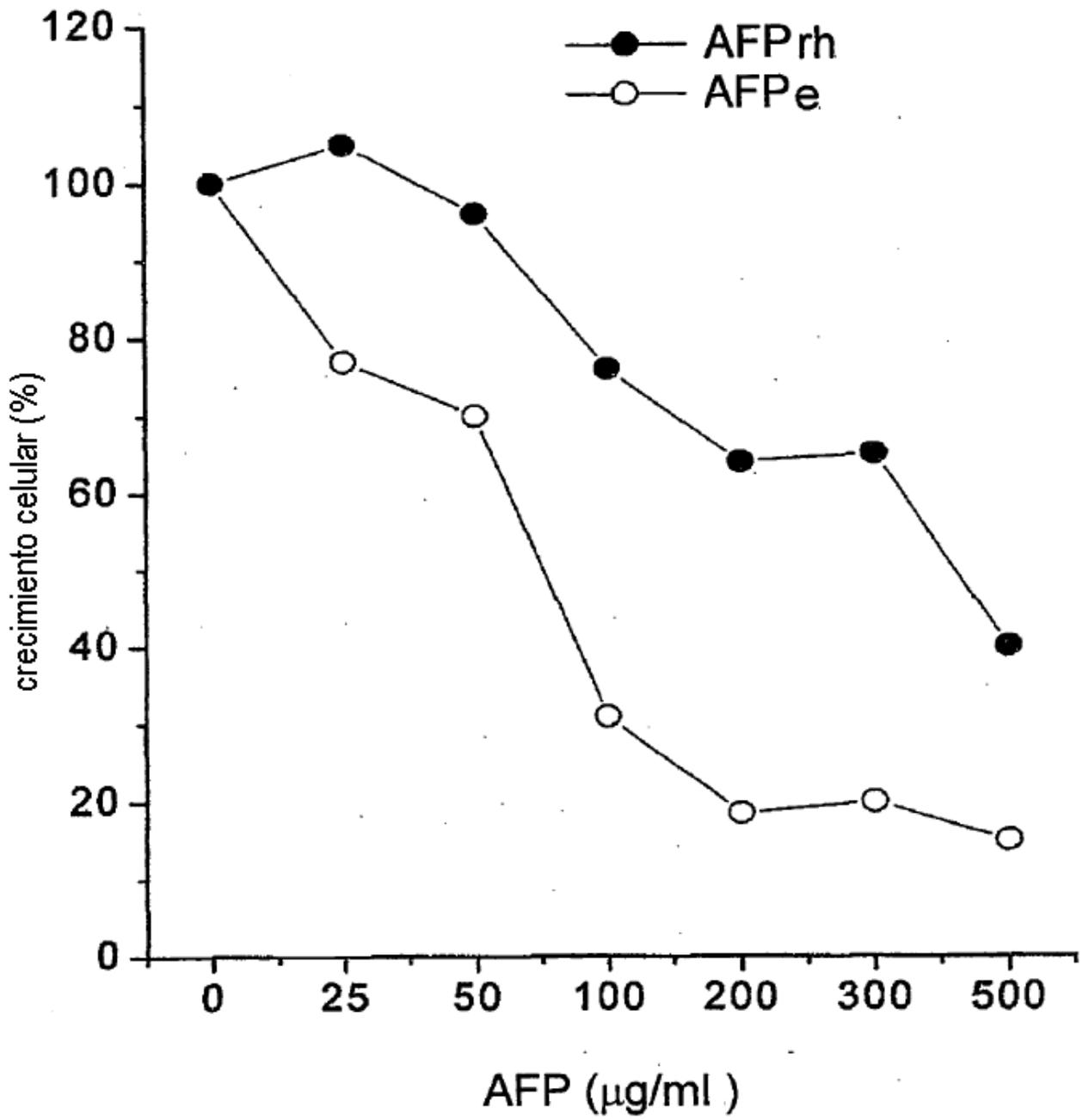


FIG.4

**FIG.5**

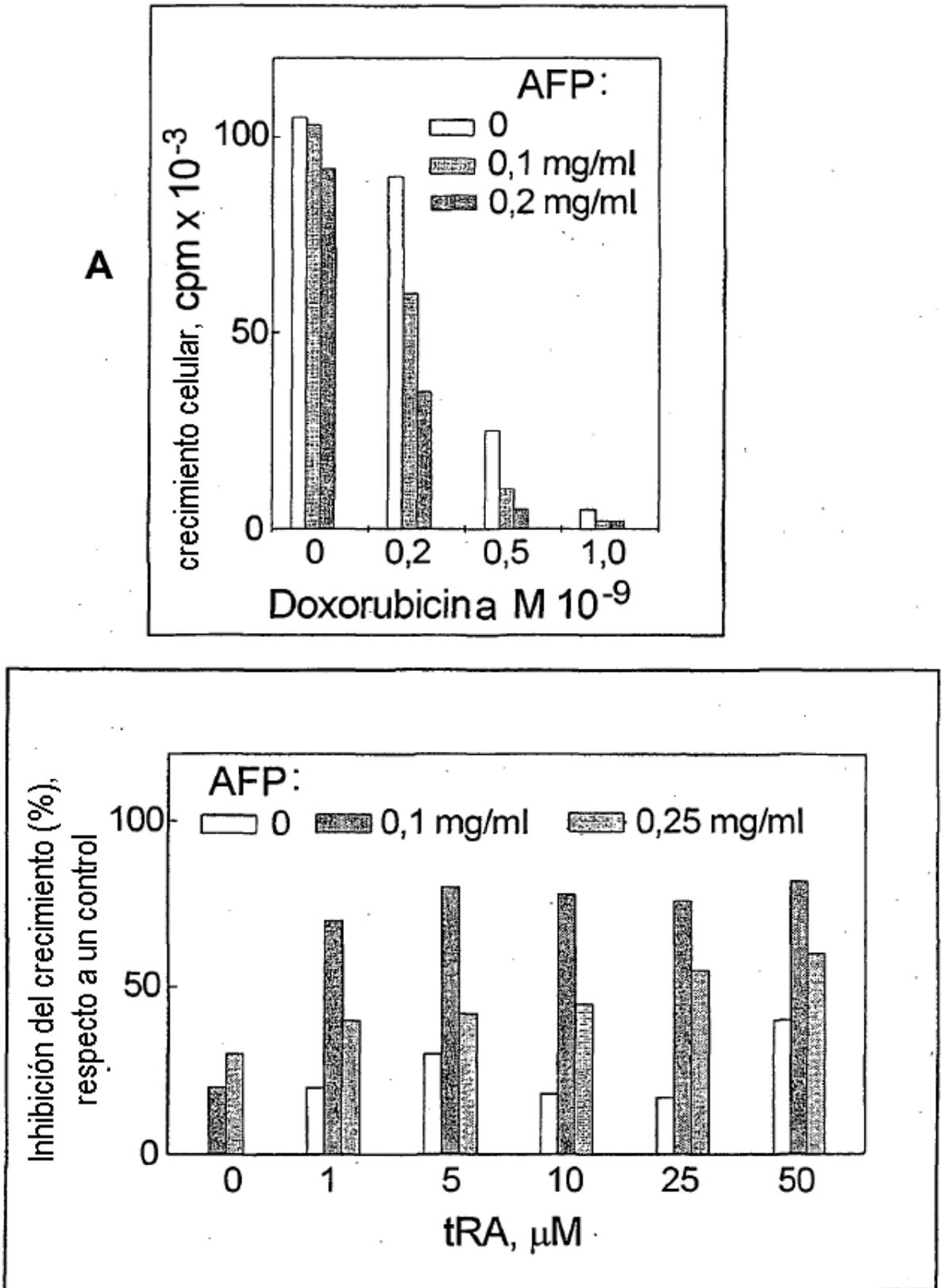


FIG.6

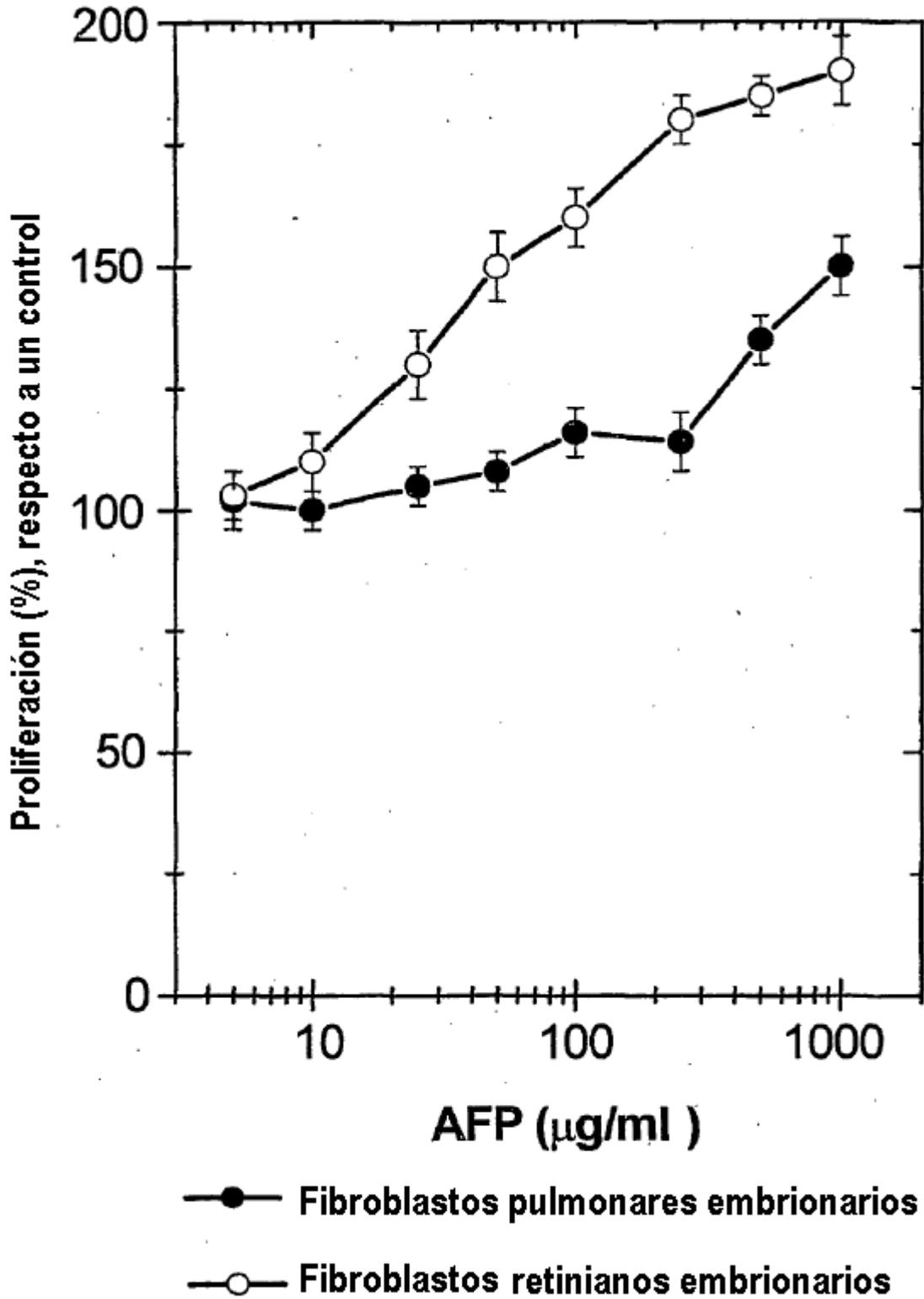


FIG.7