

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 341**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2003 E 03721538 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1496926**

54 Título: **Uso de fusiones de proteína/péptido de transtiretina para aumentar la semivida sérica de péptidos/proteínas farmacológicamente activos**

30 Prioridad:

04.04.2002 US 117109

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.04.2013

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**WALKER, KENNETH y
XIONG, FEI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 400 341 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

Uso de fusiones de proteína/péptido de transtiretina para aumentar la semivida sérica de péptidos/proteínas farmacológicamente activos

5 Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud de EE.UU. nº 10/117.109, presentada el 4 de abril de 2002.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas, péptidos y otras moléculas farmacológicas para uso terapéutico están actualmente disponibles en formas adecuadas y en cantidades suficientes en gran medida como resultado de los avances en las tecnologías de ADN recombinante. La disponibilidad de dichos péptidos y proteínas ha generado avances en la formulación y modificación química de proteínas. La modificación química de péptidos, proteínas, oligonucleótidos y otros fármacos biológicamente activos con fines de alargar la semivida sérica de dichos agentes bioactivos se ha estudiado extensamente. La capacidad de alargar la semivida sérica de dichos agentes permite alcanzar el potencial terapéutico del agente sin necesidad de altas dosificaciones y una administración frecuente.

15 La modificación química usada para alargar las semividas de proteínas *in vivo* incluye la conjugación química de un polímero hidrosoluble, tal como polietilenglicol (PEG), con la proteína de interés. Se han usado una variedad de enfoques para ligar las moléculas de polietilenglicol con la proteína (PEGilación). Por ejemplo, Royer (patente de EE.UU. nº 4.002.531) afirma que se usó alquilación reductora para el ligamiento de moléculas de polietilenglicol con una enzima. Davis *et al.* (patente de EE.UU. nº 4.179.337) dan a conocer conjugados de PEG:proteína que implican, por ejemplo, enzimas e insulina. Shaw (patente de EE.UU. nº 4.904.584) da a conocer la modificación del número de
20 residuos de lisina en proteínas para el ligamiento de moléculas de polietilenglicol mediante grupos amina reactivos. Hakimi *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.834.594) dan a conocer conjugados de PEG:proteína hidrosolubles sustancialmente no inmunogénicos que implican, por ejemplo, las proteínas IL-2, interferón α e IL-1ra. Los métodos de Hakimi *et al.* implican el uso de ligadores únicos para conectar los diversos grupos amino libres en la proteína con el PEG. Kinstler *et al.* (patentes de EE.UU. nº 5.824.784 y 5.985.265) enseñan métodos que permiten proteínas modificadas químicamente en el extremo N de forma selectiva y análogos de las mismas, incluyendo G-CSF e interferón de consenso.

30 Otros enfoques diseñados para alargar la semivida sérica de agentes bioactivos incluyen: la conjugación del péptido con una proteína grande estable que sea demasiado grande para filtrarse a través de los riñones (por ejemplo, seroalbúmina); G. D. Mao *et al.*, Biomat., Art. Cells, Art. Org. 17: 229-244 (1989); el uso de lipoproteínas de baja y alta densidad como vehículos de transporte y para aumentar la semivida sérica; P. Chris de Smidt *et al.*, Nuc. Acids. Res., 19(17): 4695-4700 (1991); el uso de la región Fc de inmunoglobulinas para producir fusiones de Fc-proteína; documento PCT WO 98/28427 (Mann *et al.*, y las referencias citadas en el mismo); y el uso del dominio Fc para aumentar la semivida *in vivo* de uno o más péptidos biológicamente activos; documento PCT WO 00/24782 (Feige *et al.*, y las referencias citadas en el mismo).

35 La transtiretina (TTR) (anteriormente denominada prealbúmina) es una proteína sérica tetramérica de 56 kDa que desempeña papeles fisiológicos importantes como transportador de tiroxina y proteína de unión a retinol; Hamilton y Benson, Cell. Mol. Life Sci., 58: 1491-1521 (2001) y las referencias citadas en el mismo. Blaney *et al.*, en la patente de EE.UU. nº 5.714.142, describen la explotación de TTR al dotar al fármaco a administrar de una funcionalidad que le permita unirse específicamente a la proteína. Específicamente, Blaney *et al.* demuestran que el ligamiento covalente de un péptido, proteína, nucleótido, oligonucleótido, oligosacárido u otro fármaco con un ligando selectivo de transtiretina unirá reversiblemente el fármaco con la TTR y aumentará así la semivida sérica del agente basándose en la afinidad del ligando por TTR. Se afirma que la actividad intrínseca del fármaco no se altera de forma adversa y que el conjugado de fármaco-ligando de TTR resultante seguirá siendo suficientemente pequeño para absorción oral.

45 Compendio de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones.

50 Se ha encontrado sorprendentemente y de forma importante que la TTR (o una variante de TTR), y en particular una TTR o variante de TTR que se ha modificado químicamente mediante conjugación con un polímero hidrosoluble, puede usarse, por ejemplo, como copartícipe de fusión con un agente biológicamente activo para aumentar la semivida sérica del agente biológicamente activo. Por consiguiente, la presente invención proporciona un medio para aumentar la semivida sérica de un agente biológicamente activo seleccionado.

55 La presente invención se refiere por tanto a preparaciones sustancialmente homogéneas de fusiones de TTR (o una variante de TTR)-agente biológicamente activo y fusiones de PEG-TTR (PEG-variante de TTR)-agente biológicamente activo. En comparación con el agente biológicamente activo solo, la fusión de TTR-agente biológicamente activo y/o fusión de PEG-TTR-agente biológicamente activo tiene una semivida sérica sustancialmente aumentada.

La presente invención se refiere adicionalmente a fusiones de TTR-agente biológicamente activo y fusiones de PEG-TTR-agente biológicamente activo en un portador farmacéuticamente aceptable que proporcionan un compuesto farmacológicamente activo.

5 Se describe la preparación de variantes de TTR. Específicamente, se modifican las proteínas TTR de tal modo que se introducen por ingeniería genética un residuo o residuos de cisteína en la secuencia de proteína TTR. Las variantes de TTR son recuperables con alto rendimiento y se modifican químicamente entonces mediante conjugación con un polímero hidrosoluble en el residuo de cisteína, proporcionando una variante de TTR químicamente modificada que puede fusionarse entonces con un agente biológicamente activo seleccionado.

10 Se describen procesos para preparar compuestos farmacológicamente activos. Por ejemplo, el método para preparar una preparación sustancialmente homogénea de una fusión de PEG-TTR-péptido comprende: (a) introducir por ingeniería genética un residuo de cisteína en una posición aminoacídica específica de la secuencia aminoacídica de dicha TTR, proporcionando una variante de dicha TTR; (b) conjugar un polietilenglicol con dicha variante de TTR en dicho residuo de cisteína, proporcionando una PEG-TTR; (c) fusionar dicha PEG-TTR con un péptido de interés, proporcionando una fusión de PEG-TTR-péptido y (d) aislar dicha fusión de PEG-TTR-péptido.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gel de SDS que exhibe la purificación de una variante de transtiretina (TTR) humana recombinante expresada en *E. coli* (C10A/GB3C) con un péptido bradiginina fusionado con el extremo C de la TTR. El carril 1 contiene los patrones de peso molecular Novex Mark 12 y los carriles 2-7 contienen respectivamente lo siguiente: lisado celular, sobrenadante postcalentamiento, agrupamiento de la etapa de cromatografía con Q-Sepharose, agrupamiento de la etapa de cromatografía con fenil-Sepharose, agrupamiento de la etapa de cromatografía con hidroxipatito y agrupamiento de la etapa de cromatografía con Source Q.

La Figura 2 demuestra mediante cromatografía de exclusión por tamaño que la fusión de péptidos con el extremo amino o extremo carboxilo de una variante de TTR, TTR(C10A/G83C), no altera su estructura oligomérica. La línea continua es TTR(C10A/G83C), la línea de trazos es hormona paratiroidea (PTH) fusionada con el extremo amino de TTR(C10A/G83C) y la línea de puntos es bradiginina fusionada con el extremo carboxilo de TTR(C10A/G83C).

La Figura 3 demuestra mediante cromatografía de exclusión por tamaño que la fusión de proteínas con el extremo amino o extremo carboxilo de una variante de TTR, TTR(C10A), no altera su estructura oligomérica. La línea continua es TTR(C10A), la línea de trazos es IL-1ra fusionada con el extremo carboxilo de TTR(C10A) y la línea de puntos es IL-1ra fusionada con el extremo amino de TTR(C10A).

30 La Figura 4 muestra la unión observada usando BIAcore de diversos constructos de TPO-péptido mimético (TMP) con receptor de MPL humano: ■ Fc-TMP, ● TMP(m)-TTR, ▲ TMP(m)-TTR-PEG 5K, ▼ TMP(m)-TTR-PEG 20K.

La Figura 5 muestra que la inyección de TMP(m)-TTR-PEG 5K induce la formación de plaquetas en ratones. Los siguientes símbolos corresponden a los correspondientes constructos: ■ portador, ● Fc-TMP, ▲ TTR-TMP, ▼ TMP(m)-TTR y ◆ TMP(m)-TTR-PEG 5K.

35 La Figura 6 demuestra mediante cromatografía de exclusión por tamaño que TTR nativa y TTR(C10A) mantienen una configuración oligomérica similar (un tetrámero aparente). La línea continua es TTR nativa y la línea de trazos es TTR(C10A).

La Figura 7 demuestra mediante cromatografía de exclusión por tamaño que la conjugación de PEG con TTR aumenta su tamaño molecular de manera predeciblemente uniforme. Las líneas continuas indican sin PEG conjugado, las líneas de trazos indican fusionado con PEG 5K y las líneas de puntos indican fusionado con PEG 20K. Se usaron los siguientes constructos: A) TMP-TTR(C10A/A37C), B) TMP-TTR(C10A/D38C), C) TMP-TTR(C10A/A81C) y D) TMP-TTR(C10A/G83C).

45 La Figura 8 es un gel de SDS que exhibe la extensión de la pegilación de diversos constructos de TMP-TTR que implican variantes de TTR que tienen una cisteína no nativa introducida por ingeniería genética en una de cuatro diferentes localizaciones. El carril 1 contiene los patrones de peso molecular Novex Mark 12; el carril 2 es TMP-TTR(C10A/A37C) no pegilada; los carriles 3-6 son versiones pegiladas de 5K de TMP-TTR(C10A/A37C), TMP-TTR(C10A/D38C), TMP-TTR(C10A/A81C) y TMP-TTR(C10A/G83C) respectivamente; los carriles 7-10 son versiones pegiladas de 20K de TMP-TTR(C10A/A37C), TMP-TTR(C10A/D38C), TMP-TTR(C10A/A81C) y TMP-TTR(C10A/G83C) respectivamente.

50 Las Figuras 9A-C comparan la unión competitiva de Fc-TMP y TMP-TTR con MPL humana mediante análisis BIAcore. A) ■ Fc-TMP, ● TMP-TTR(C10A/A37C), ▲ TMP-TTR(C10A/D38C), ▼ TMP-TTR(C10A/A81C), ◆ TMP-TTR(C10A/G83C). B) ■ Fc-TMP, versiones pegiladas de 5K de TMP-TTR(C10A/A37C) (●), TMP-TTR(C10A/D38C) (▲), TMP-TTR(C10A/A81C) (▼), TMP-TTR(C10A/G83C) (◆). C) ■ Fc-TMP, versiones pegiladas de 20K de TMP-TTR(C10A/A37C) (●), TMP-TTR(C10A/D38C) (▲), TMP-TTR(C10A/A81C) (▼), TMP-TTR(C10A/G83C) (◆).

Las Figuras 10A-C muestran que la inyección de TMP-TTR con PEG conjugado con las cisteínas introducidas por ingeniería genética induce la formación de plaquetas en ratones. A). ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, ▲ TMP-TTR(C10A/A37C), ▼ TMP-TTR(C10A/D38C) (carboxamidometilada), ◆ TMP-TTR(C10A/A81C), ◀ TMP-TTR(C10A/G83C). B). ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, versiones pegiladas de 5K de TMP-TTR(C10A/A37C) (▲), TMP-TTR(C10A/D38C) (▼), TMP-TTR(C10A/A81C) (◆), TMP-TTR(C10A/G83C) (◀). C). ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, versiones pegiladas de 20K de TMP-TTR(C10A/A37C) (▲), TMP-TTR(C10A/D38C) (▼), TMP-TTR(C10A/A81C) (◆), TMP-TTR(C10A/G83C) (◀).

La Figura 11 muestra que la inyección de PTH-TTR con PEG conjugado con cisteínas introducidas por ingeniería genética induce la liberación de calcio ionizado en ratones. Los siguientes símbolos corresponden a los correspondientes constructos: ■ TTR(C10A), ● PTH-Fc, ▲ PTH-TTR, ▼ PTH-TTR(C10A/K15A/A37C) (carboxamidometilada), ◆ versión pegilada de 5K de PTH-TTR(C10A/K15A/A37C), ◀ versión pegilada de 20K de PTH-TTR(C10A/K15A/A37C), ► PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) (carboxamidometilada), ● versión pegilada de 5K de PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) y ★ versión pegilada de 20K de PTH-TTR(C10A/K15A/G83C).

La Figura 12 muestra que la inyección de péptido 1 de tipo glucagón (GLP1)-TTR con PEG conjugado con cisteínas introducidas por ingeniería genética reduce los niveles sanguíneos de glucosa en ratones. Los siguientes símbolos corresponden a los correspondientes constructos: ■ TTR(C10A), ● GLP1-Fc, ▲ GLP1-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 5K) y ▼ GLP1-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 20K).

La Figura 13 muestra que la inyección de conjugados de TMP-TTR con dominios CH2 fusionados aumenta los niveles séricos de plaquetas en ratones. Los siguientes símbolos corresponden a los correspondientes constructos: ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, ▲ TMP-TTR(C10A)-CH2, ▼ TTR(C10A)-CH2-TMP y ◆ TMP-CH2-TTR(C10A).

La Figura 14 muestra que la inyección de fusiones carboxiterminales de TMP con TTR pegilada aumenta los recuentos sanguíneos de plaquetas en ratones. Los siguientes símbolos corresponden a los correspondientes constructos: ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, ▲ TTR(C10A/K15A/A37C)-TMP (PEG 20K), ▼ TTR(C10A/K15A/A81C)-TMP (PEG 20K), ◆ TTR(C10A/K15A/G83C)-TMP (PEG 20K), ◀ TMP-TTR(C10A/K15A/A37C) (PEG 20K), ► TMP-TTR(C10A/K15A/A81C) (PEG 20K), ● TMP-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 20K).

Las Figuras 15 A-C muestran que la inyección de fusiones de TMP-TTR pegiladas que contienen una alteración K15A aumenta los recuentos sanguíneos de plaquetas en ratones. Los siguientes símbolos corresponden a los correspondientes constructos: A) ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, ▲ TMP-TTR(C10A/K15A/A37C) (carboxamidometilada), y ▼ TMP-TTR(C10A/K15A/A81C) (carboxamidometilada); B), ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, ▲ TMP-TTR(C10A/K15A/A37C) (PEG 5K), ▼ TMP-TTR(C10A/K15A/A81C) (PEG 5K) y ◆ TMP-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 5K); C) ■ TTR(C10A), ● Fc-TMP, ▲ TMP-TTR(C10A/K15A/A37C) (PEG 20K), ▼ TMP-TTR(C10A/K15A/A81C) (PEG 20K) y ◆ TMP-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 20K).

Descripción detallada de la invención

Con el fin de describir la presente invención, se definen los siguientes términos como se expone a continuación.

El término "agente biológicamente activo" designa cualquier material o compuesto químico útil para aplicación profiláctica, terapéutica o diagnóstica. El término "compuesto farmacológicamente activo" designa un compuesto adecuado para administración a un mamífero, preferiblemente un individuo humano, que induce un efecto local o sistémico deseado.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" describen un tipo de agentes biológicamente activos, y los términos se usan intercambiamente en la presente memoria para designar un polímero de aminoácidos de origen natural, producido recombinantemente o sintetizado químicamente. Se pretende que los términos incluyan moléculas peptídicas que contienen solo 2 aminoácidos, polipéptidos modificados químicamente, moléculas de consenso, análogos, derivados o combinaciones de los mismos.

Puede usarse cualquier número de péptidos junto con la presente invención. Son de particular interés los péptidos que imitan la actividad de eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1), hormona paratiroidea (PTH), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1ra), leptina, antígeno 4 de linfocito T citotóxico (CTLA4), ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), factor de crecimiento tumoral α y β (TGF- α y TGF- β , respectivamente) y hormonas de crecimiento. Los términos "péptido mimético" y "péptido agonista" designan un péptido que tiene una actividad biológica comparable con una proteína (por ejemplo, GLP-1, PTH, EPO, TPO, G-CSF, etc.) que interacciona con una proteína de interés. Estos términos incluyen adicionalmente péptidos que imitan indirectamente la actividad de una proteína de interés, tal como potenciando los efectos del ligando natural de la proteína de interés. Por tanto, el término "péptido mimético de EPO" comprende cualquier péptido que pueda identificarse o derivarse por tener material en cuestión mimético de EPO; véase, por ejemplo, Wrighton *et al.*, *Science*, 273: 458-63 (1996) y Naranda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7569-74 (1999). Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilita seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

El término “péptido mimético de TPO” (TMP) comprende péptidos que pueden identificarse o derivarse por tener material en cuestión mimético de TPO; véase, por ejemplo, Cwirla *et al.*, Science, 276: 1696-9 (1997); patentes de EE.UU. nº 5.869.451 y 5.932.946 y PCT WO 00/24782 (Liu *et al.* y las referencias citadas en los mismos).

5 Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilita seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

El término “péptido mimético de G-CSF” comprende cualquier péptido que pueda identificarse por tener material en cuestión mimético de G-CSF; véase, por ejemplo, Paukovits *et al.*, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 365: 303-11, (1984). Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilita seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

El término “péptido mimético de CTLA4” comprende cualquier péptido que pueda identificarse o derivarse como se describe en Fukumoto *et al.*, Nature Biotech. 16: 267-70 (1998). Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilitan seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

15 Son también de interés los antagonistas peptídicos, particularmente aquellos antagonistas de la actividad de TNF, leptina, cualquiera de las interleucinas y proteínas implicadas en la activación del complemento (por ejemplo, C3b). El término “péptido antagonista” o “péptido inhibidor” designa un péptido que bloquea o interfiere de alguna manera con la actividad biológica de la proteína de interés asociada, o que tiene una actividad biológica comparable con un antagonista o inhibidor conocido de la proteína de interés asociada. Por tanto, el término “péptido antagonista de TNF” comprende péptidos que pueden identificarse o derivarse por tener material en cuestión antagonista de TNF; véase, por ejemplo, Takasaki *et al.*, Nature Biotech., 12: 1266-70 (1997). Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilita seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

25 Los términos “antagonista de IL-1” y “péptido mimético de IL-1ra” comprenden péptidos que inhiben o regulan negativamente la activación del receptor de IL-1 por IL-1. La activación del receptor de IL-1 da como resultado la formación de un complejo entre IL-1, receptor de IL-1 y proteína accesoria del receptor de IL-1. El antagonista de IL-1, o péptido mimético de IL-1ra, se une a IL-1, receptor de IL-1 o proteína accesoria del receptor de IL-1 e impide la formación de complejo entre dos o tres cualesquiera componentes del complejo. Los péptidos antagonistas de IL-1 o miméticos de IL-1ra ejemplares pueden identificarse o derivarse como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.608.035, 5.786.331, 5.880.096. Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilita seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

35 El término “péptido antagonista de VEGF” comprende péptidos que pueden identificarse o derivarse por tener material en cuestión antagonista de VEGF; véase, por ejemplo, Fairbrother, Biochem., 11: 17754-64 (1998). Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilita seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

40 El término “péptido inhibidor de MMP” comprende péptidos que pueden identificarse o derivarse por tener material en cuestión inhibidor de MMP; véase, por ejemplo, Koivunen, Nature Biotech., 17: 768-74 (1999). Los expertos en la técnica aprecian que cada una de estas referencias posibilita seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes colecciones peptídicas.

Los péptidos orientadores son también de interés, incluyendo péptidos guiados a tumor y péptidos de transporte de membrana.

45 Pueden generarse aleatoriamente péptidos ejemplares mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, las técnicas de síntesis en fase sólida son bien conocidas en la materia, e incluyen aquellas descritas en Merrifield, Chem. Polypeptides, pág. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds) (1973); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1963); Davis *et al.*, Biochem. Intl., 10: 394-414 (1985); Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis (1969); patente de EE.UU. nº 3.941.763; Finn *et al.*, “The Proteins”, 3ª ed., 2: 105-253 (1976) y Erickson *et al.*, “The Proteins”, 3ª ed., 2: 257-527 (1976). La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para preparar péptidos individuales, puesto que es el método más económico para preparar péptidos pequeños.

50 La exposición en fago es otro método útil en la generación de péptidos para uso en la presente invención. Se ha afirmado que puede usarse la selección por afinidad de colecciones de péptidos aleatorios para identificar ligandos peptídicos para cualquier sitio de cualquier producto génico; Dedman *et al.*, J. Biol. Chem., 268: 23025-30 (1993). La exposición en fago es particularmente bien adecuada para identificar péptidos que se unen a proteínas de interés tales como receptores de superficie celular o cualquier proteína que tenga epítomos lineales; Wilson *et al.*, Can. J. Microbiol., 44: 313-29 (1998); Kay *et al.*, Drug Disc. Today, 1: 370-8 (1998). Dichas proteínas se revisan extensamente en Herz *et al.*, J. Receptor & Signal Transduction Res., 17(5): 671-776 (1997).

Los péptidos pueden prepararse también en células hospedadoras transformadas usando técnicas de ADN recombinante. Para hacer eso, se prepara una molécula de ADN recombinante que codifica el péptido. Los métodos de preparación de dichas moléculas de ADN y/o ARN son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, podrían extraerse secuencias que codifican los péptidos del ADN usando enzimas de restricción adecuadas. Las secuencias relevantes pueden crearse usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la inclusión de sitios de restricción útiles para la posterior clonación. Como alternativa, la molécula de ADN/ARN podría sintetizarse usando técnicas de síntesis química tales como el método de fosforamidita. También podría usarse una combinación de estas técnicas.

Los agentes biológicamente activos adicionales contemplados para uso incluyen proteínas de origen recombinante o natural, tanto humanas como animales, hormonas, citocinas, factores hematopoyéticos, factores de crecimiento, factores antiobesidad, factores tróficos, factores antiinflamatorios y enzimas. Dichas proteínas incluyen interferones (véanse las patentes de EE.UU. n° 5.372.808, 5.541.293, 4.897.471 y 4.695.623), interleucinas (véase la patente de EE.UU. n° 5.075.222), eritropoyetinas (véanse las patentes de EE.UU. n° 4.703.008, 5.441.868, 5.618.698, 5.547.933 y 5.621.080), factores estimulantes de colonias de granulocitos (véanse las patentes de EE.UU. n° 4.810.643, 4.999.291, 5.581.476, 5.582.823 y la publicación PCT n° 94/17185), factor de citoblastos (publicaciones PCT n° 91/05795, 92/17505 y 95/17206), NESF (publicación PCT n° U594/02957), osteoprotegerina (publicación PCT n° 97/23614), antagonista de receptor de interleucina (IL-1ra) (publicaciones PCT n° 91/08285 y 92/16221) y leptina (proteína OB) (publicaciones PCT n° 96/40912, 96/05309, 97/00128, 97/01010 y 97/06816).

Además, los agentes biológicamente activos pueden incluir también insulina, gastrina, prolactina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de foliculo (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), motilina, interferones (α , β , γ), interleucinas (de IL-1 a IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF), proteína de unión al factor de necrosis tumoral (TNF-bp), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), factor neurotrófico 3 (NT3), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento neurotrófico (NGF), factores de crecimiento óseos tales como osteoprotegerina (OPG), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento derivado de megacariocitos (MGDF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), trombopoyetina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGDF), factores de crecimiento simuladores de colonias (CSF), proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa (SOD), activador de plasminógeno de tejido (TPA), urocinasa, estreptocinasa y caliceína.

La transtiretina (TTR) contemplada para uso en la presente invención tendrá las secuencias de ADN y aminoácídica de TTR como se reseñan en Mita *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 124(2): 558-564 (1984). Estas secuencias se han depositado en Genbank con el número de acceso K02091. La secuencia de TTR de 127 aminoácidos usada en la presente memoria no incluye la secuencia señal (aminoácidos 1-20) de la secuencia K02091 y se exhibe a continuación como SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:1

**GPTGTGESKCPMLMKVLDVAVRGS PAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSSESGEL
HGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAAL
LSPYSYSTTAVVTNPKE**

El término "variante de TTR" designa una molécula o secuencia que es una forma modificada de una TTR nativa. Por ejemplo, una TTR nativa comprende sitios que pueden eliminarse debido a que proporcionan rasgos estructurales o de actividad biológica que no son necesarios para las moléculas de fusión de la presente invención. Por tanto, el término "variante de TTR" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de TTR nativa o en que se ha reemplazado uno o más sitios o residuos de TTR nativa por un aminoácido diferente o en que se ha añadido uno o más residuos a la secuencia. Con fines ejemplares, una variante de TTR en la que se ha reemplazado el residuo de alanina en la posición de secuencia aminoácídica 37 por un residuo de cisteína, se designará variante de TTR (A37C), y una variante de TTR en la que se han reemplazado el residuo de alanina en la posición de secuencia aminoácídica 37 y el residuo de glicina en la posición de secuencia aminoácídica 83 por un residuo de cisteína, se designará variante TTR (A37C/G83C).

En una realización, puede fusionarse una TTR o variante de TTR fusionada con un agente biológicamente activo con una tercera proteína o fragmento de proteína que estabiliza adicionalmente la proteína de fusión TTR-agente biológicamente activo, y aumenta así la semivida de la fusión resultante en suero. Los ejemplos de dichas proteínas o fragmentos de las mismas adicionales que pueden usarse en dichos métodos y composiciones incluyen el dominio Fc o el dominio CH2 de una inmunoglobulina, o cualquier otro dominio de proteína que un experto en la técnica reconozca que tiene propiedades que aumentarían la estabilidad de la proteína (véase, por ejemplo, el Ejemplo 29 siguiente). Dichos grupos de proteínas pueden fusionarse con el extremo carboxilo o amino de la proteína de fusión TTR-agente biológicamente activo, o pueden disponerse entre la TTR y el agente biológicamente activo. Se

contempla que puedan disponerse ligadores o espaciadores, según sea necesario, entre cada uno de los dominios de la proteína de fusión para facilitar su actividad deseada.

En otra realización, la TTR o variante de TTR de la invención puede reticularse químicamente con el agente biológicamente activo. La reticulación de proteínas puede efectuarse usando, por ejemplo, 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) según procedimientos establecidos publicados. Están fácilmente disponibles agentes de reticulación adicionales y pueden identificarse por un experto en la técnica. Para los detalles del procedimiento anterior, véanse, por ejemplo, Karpovsky *et al.*, *J. Exp. Med.* 160, 1686-1701 (1984); Pérez *et al.*, *Nature*, 316, 354-356 (1985) o Titus *et al.*, *Journal of Immunology*, 139, 3153-3158 (1987).

En otra realización, puede enlazarse covalentemente una molécula con la proteína de fusión de tal modo que aumente la estabilidad y/o semivida sérica. Por ejemplo, puede modificarse químicamente una TTR o variante de TTR preferida usando polímeros hidrosolubles tales como polietilenglicol (PEG). El grupo de PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente y puede ser de cadena lineal o ramificada. El peso molecular medio del PEG estará preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, lo más preferiblemente de aproximadamente 20 kDa.

Los grupos de PEG se ligarán generalmente con los compuestos de la invención mediante acilación, alquilación reductiva, adición de Michael, tioalquilación u otros métodos de conjugación/ligamiento quimiosselectivos a través de un grupo reactivo en el resto PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, haloacetilo, maleimido o hidrazino) con un grupo reactivo en el compuesto diana (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, etiol, haloacetilo, maleimido o hidrazino).

Otros polímeros hidrosolubles usados incluyen copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano.

Puede prepararse una molécula de ADN que codifica el péptido de interés, proteína de interés, TTR o variante de TTR usando métodos de tecnología de ADN recombinante bien conocidos tales como los expuestos en Sambrook *et al.* ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY [1989]) y/o Ausubel *et al.*, eds. "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishers Inc. y Wiley and Sons, NY (1994). Puede obtenerse un gen o ADNc que codifica la proteína de interés o fragmento de la misma, por ejemplo, cribando una colección genómica o de ADNc con una sonda adecuada. Las sondas adecuadas incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos, fragmentos de ADNc o fragmentos de ADN genómico que se espera que tengan cierta homología con el gen que codifica la proteína de interés, de tal modo que la sonda hibridará con el gen que codifica la proteína de interés en condiciones de hibridación selectivas. Un medio alternativo de cribar una colección de ADN es mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica la proteína de interés. La PCR se logra típicamente usando "cebadores" oligonucleotídicos que tienen una secuencia que se cree que tiene suficiente homología con el gen que se va a amplificar, de tal modo que hibridará al menos una porción suficiente del cebador con el gen.

Como alternativa, puede prepararse un gen que codifica el péptido de interés o proteína de interés mediante síntesis química usando métodos bien conocidos por el experto en la técnica tales como los descritos por Engels *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28: 716-734 (1989). Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos de fosfotriéster, fosforamidita y H-fosfonato para la síntesis de ácido nucleico. Es un método preferido para dicha síntesis química la síntesis soportada por polímeros que usa la química de fosforamidita estándar. Típicamente, el ADN que codifica la proteína de interés será de varios cientos de nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos mayores de aproximadamente 100 nucleótidos pueden sintetizarse como varios fragmentos usando estos métodos. Los fragmentos pueden ligarse entonces conjuntamente formando un gen que codifica la proteína de interés completa. Habitualmente, el fragmento de ADN que codifica el extremo amino del polipéptido tendrá un ATG, que codifica un residuo de metionina. Esta metionina puede estar presente o no en la forma madura de la proteína de interés. La metionina puede eliminarse dentro de la célula o durante el proceso de secreción. Los polipéptidos de TTR preferidos pueden incluir TTR con la secuencia de ácido nucleico alterada para optimizar la expresión en *E. coli* y para introducir sitios de restricción convenientes. Se describe una discusión general de la optimización de codón para expresión en *E. coli* en Kane, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6: 494-500 (1995).

Una vez se han obtenido los genes que codifican la proteína de interés y el polipéptido de TTR, pueden modificarse usando métodos estándares para crear sitios de endonucleasa de restricción en los extremos 5' y/o 3'. La creación de los sitios de restricción permite insertar los genes apropiadamente en vectores de amplificación y/o expresión. La adición de sitios de restricción se logra típicamente usando PCR, en que un cebador de cada reacción de PCR contiene típicamente, entre otros, la secuencia nucleotídica del sitio de restricción deseado.

El gen o ADNc que codifica el péptido de interés o proteína de interés puede insertarse en un vector de expresión apropiado para expresión en una célula hospedadora. El vector se selecciona para que sea funcional en la célula hospedadora particular empleada (concretamente, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora de tal modo que pueda ocurrir la amplificación y/o expresión del gen que codifica la proteína de interés).

Típicamente, los vectores usados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán un promotor (también designado como una “secuencia flanqueante en 5'”) y otros elementos reguladores así como uno o unos potenciadores, un elemento de origen de replicación, un elemento de terminación transcripcional, un elemento de sitio de unión a ribosoma, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar y un elemento de marcador seleccionable. Cada uno de estos elementos se discute a continuación. Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia de ADN “marcadora”, concretamente una secuencia oligonucleotídica localizada en el extremo 5' o 3' del constructo de ADN de fusión. El ADN marcador codifica una molécula tal como hexaHis, *c-myc*, FLAG (Invitrogen, San Diego, CA) u otra secuencia inmunogénica pequeña. Cuando se dispone en el marco de lectura apropiado, este marcador se expresará junto con la proteína de fusión, y puede servir como marcador de afinidad para la purificación de la proteína de fusión de la célula hospedadora. Opcionalmente, el marcador puede eliminarse posteriormente de la proteína de fusión purificada mediante diversos medios tales como usar una peptidasa seleccionada, por ejemplo.

El promotor puede ser homólogo (concretamente, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogo (concretamente, de una especie distinta de la especie o cepa de célula hospedadora), híbrido (concretamente, una combinación de promotores de más de una fuente), sintético o puede ser el promotor de la proteína de interés nativa. Adicionalmente, el promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible. Como tal, la fuente del promotor puede ser cualquier organismo unicelular procariótico o eucariótico, cualquier organismo vertebrado o invertebrado o cualquier planta, a condición de que el promotor sea funcional y puede activarse por la maquinaria de la célula hospedadora.

Los promotores útiles en los vectores de esta invención pueden obtenerse mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la materia. Típicamente, los promotores útiles en la presente memoria se habrán identificado anteriormente mediante cartografía y/o digestión con endonucleasa de restricción y pueden aislarse por tanto de la fuente de tejido apropiado usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede ser conocida la secuencia nucleotídica completa del promotor. Aquí, el promotor puede sintetizarse usando los métodos descritos anteriormente para síntesis de ácido nucleico o clonación.

Cuando se conoce toda o solo una porción de la secuencia del promotor, puede obtenerse el promotor completo usando PCR y/o cribando una colección genómica con fragmentos de secuencia oligonucleotídica y/o flanqueante en 5' de la misma u otra especie.

Los promotores adecuados para practicar esta invención son promotores inducibles tales como el promotor *lux*, el promotor *lac*, el promotor de arabinosa, el promotor *trp*, el promotor *tac*, el promotor *tna*, promotores λ sintéticos (del bacteriófago λ) y los promotores T7 o T7. Los promotores preferidos incluyen los promotores *lux* y *lac*.

El elemento de origen de replicación es típicamente una parte de vectores de expresión procarióticos adquiridos comercialmente o contruidos por el usuario. En algunos casos, la amplificación del vector a un cierto número de copias puede ser importante para la expresión óptima de la proteína o polipéptido de interés. En otros casos, se prefiere un número de copias constante. En cualquier caso, puede seleccionarse fácilmente un vector con un origen de replicación que satisfaga los requisitos por el experto en la técnica. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse químicamente uno basándose en una secuencia conocida, y ligarse con el vector.

El elemento de terminación de la transcripción se localiza típicamente en 3' del extremo del constructo de ADN de la proteína de fusión y sirve para terminar la transcripción del mensaje de ARN que codifica el polipéptido de fusión. Habitualmente, el elemento de terminación de la transcripción en células procarióticas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia de poli-T. Aunque el elemento se clona fácilmente a partir de una colección o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, puede sintetizarse también fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los descritos anteriormente.

Los vectores expresión contienen típicamente un gen que codifica un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula hospedadora cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol o kanamicina para células hospedadoras procarióticas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos. Son marcadores seleccionables preferidos el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina, el gen de resistencia a cloranfenicol y el gen de resistencia a tetraciclina.

El elemento de unión a ribosoma, denominado comúnmente secuencia de Shine-Dalgarno en procariotas, es necesario para la iniciación de la traducción del ARNm. El elemento está localizado típicamente en 3' del promotor y en 5' de la secuencia de codificación del constructo de ADN de la proteína de fusión. La secuencia de Shine-Dalgarno es variable, pero es típicamente una polipurina (concretamente, tiene un alto contenido de A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales puede sintetizarse fácilmente usando los métodos expuestos anteriormente y usarse en un vector procariótico.

Cuando uno o más de los elementos expuestos anteriormente no está ya presente en el vector a usar, puede obtenerse individualmente y ligarse con el vector. Los métodos usados para obtener cada uno de los elementos son bien conocidos por el experto en la técnica y son comparables con los métodos expuestos anteriormente (concretamente, síntesis de ADN, cribado de colecciones).

- 5 Cada elemento puede ligarse individualmente en el vector cortando el vector con la endonucleasa o endonucleasas de restricción apropiadas de tal modo que los extremos del elemento a ligar y los extremos del vector sean compatibles para ligamiento. En algunos casos, puede ser necesario “volver romos” los extremos a ligar conjuntamente para obtener un ligamiento satisfactorio. Puede lograrse volverlos romos rellenando en primer lugar los “extremos adhesivos” usando una enzima tal como ADN polimerasa Klenow o ADN polimerasa de T4 en presencia de los cuatro nucleótidos. Este procedimiento es bien conocido y se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al., supra*.

Como alternativa, pueden ligarse conjuntamente en primer lugar dos o más de los elementos a insertar en el vector (si se van a colocar adyacentes entre sí) y ligarse entonces con el vector.

- 15 Otro método para construir el vector es realizar todos los ligamientos de los diversos elementos simultáneamente en una mezcla de reacción. Aquí, pueden generarse muchos vectores sin sentido o no funcionales debido al ligamiento o inserción inapropiada de los elementos, sin embargo, el vector funcional puede identificarse por la expresión del marcador seleccionable. La secuencia apropiada del producto de ligamiento puede confirmarse mediante digestión con endonucleasas de restricción o mediante secuenciación de ADN.

- 20 Después de construir el vector e insertar un constructo de ADN de proteína de fusión en el sitio apropiado del vector, puede insertarse el vector completado en una célula hospedadora adecuada para la expresión de la proteína de fusión.

- 25 Las células hospedadoras adecuadas para la presente invención son células bacterianas. Por ejemplo, diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, JM109, DH5a, DH10 y MC1061) son células hospedadoras bien conocidas para uso en la preparación de polipéptidos recombinantes. La elección de la cepa bacteriana se hace típicamente de modo que la cepa y el vector de expresión a usar sean compatibles. Pueden emplearse también diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otras *Bacillus spp.* y *Streptomyces spp.* en la práctica de esta invención junto con vectores de expresión apropiados.

- 30 La inserción (también designada como “transformación” o “transfección”) del vector en la célula hospedadora seleccionada puede lograrse usando métodos tales como precipitación con fosfato de calcio o electroporación. El método seleccionado será en parte función del tipo de célula hospedadora a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por el experto en la técnica y se exponen, por ejemplo en Sambrook *et al., supra*.

- 35 Las células hospedadoras que contienen el vector (concretamente, células hospedadoras transformadas o transfectadas) pueden cultivarse usando uno o más medios estándares bien conocidos por el experto en la técnica. El medio seleccionado contendrá típicamente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células hospedadoras. Son medios adecuados para cultivar células de *E. coli*, por ejemplo, caldo Luria (“LB”), caldo YT, SOB, SOC y/o caldo Terrific (“TB”).

Hay varios modos de preparar el constructo de ADN que codifica la proteína de fusión que comprende el gen de TTR, el gen que codifica el péptido o proteína de interés y, opcionalmente, una molécula de ADN que codifica un péptido ligador que está localizado entre los dos genes.

- 40 En un procedimiento, pueden ligarse conjuntamente el gen de TTR y el gen que codifica la proteína de interés (los “genes del copartícipe de fusión”) en cualquier orientación (por ejemplo, el gen de TTR en el extremo 5’ o 3’ del constructo). Cuando se va a incluir una molécula de ADN ligador, puede ligarse en primer lugar con uno de los genes del copartícipe de fusión y ese constructo puede ligarse entonces con el otro gen del copartícipe de fusión. Los ligamientos se logran típicamente usando la enzima ADN ligasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 45 Un procedimiento separado proporciona para el primer ligamiento un gen del copartícipe de fusión en el vector seleccionado, después de lo cual puede ligarse el otro gen del copartícipe de fusión con el vector en una posición que está en 3’ o 5’ del primer gen del copartícipe de fusión. Cuando se va a incluir una molécula de ADN ligador, la molécula de ADN ligador puede ligarse con el gen del copartícipe de fusión antes o después de ligar el gen con el vector.

- 50 Las TTR-TMP de la presente invención pueden usarse para tratar afecciones conocidas generalmente como aquellas que implican una deficiencia de megacariocitos/plaquetas existente o una deficiencia de megacariocitos/plaquetas esperada (por ejemplo, debido a una cirugía planeada o donación de plaquetas). Dichas afecciones serán habitualmente el resultado de una deficiencia (temporal o permanente) del ligando de Mpl activo *in vivo*. El término genérico para deficiencia de plaquetas es trombocitopenia y, por ello, los métodos y composiciones de la presente invención están generalmente disponibles para tratar trombocitopenia en pacientes necesitados de ello. La trombocitopenia (deficiencia de plaquetas) puede estar presente por diversas razones, incluyendo

quimioterapia y otras terapias con una variedad de fármacos, radioterapia, cirugía, pérdida de sangre accidental y otras afecciones patológicas específicas.

Son afecciones patológicas específicas que implican trombocitopenia y pueden tratarse de acuerdo con esta invención: anemia aplásica, trombocitopenia idiopática, tumores metastásicos que dan como resultado trombocitopenia, lupus sistémico eritematoso, esplenomegalia, síndrome de Fanconi, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, anomalía de May-Hegglin, síndrome de Wiskott-Aldrich y hemoglobinuria nocturna paroxística. También ciertos tratamientos para el SIDA dan como resultado trombocitopenia (por ejemplo, AZT). Ciertos trastornos de la curación de heridas podrían beneficiarse también de un aumento en los números de plaquetas.

10 Con respecto a deficiencias de plaquetas anticipadas, por ejemplo, debido a una cirugía futura, podría administrarse un compuesto de la presente invención de varios días a varias horas antes de la necesidad de plaquetas. Con respecto a situaciones agudas, por ejemplo, una pérdida de sangre accidental y masiva, podría administrarse un compuesto de esta invención junto con sangre o plaquetas purificadas.

15 Los compuestos de TMP de esta invención pueden ser también útiles para estimular ciertos tipos de células distintos de megacariocitos si se encuentra que dichas células expresan el receptor de Mpl. Las afecciones asociadas a dichas células que expresan el receptor de Mpl están también dentro del alcance de esta invención.

20 Los compuestos de TMP de esta invención pueden usarse en cualquier situación en que se desee la producción de plaquetas o células precursoras de plaquetas, o en que se desee la estimulación del receptor c-Mpl. Por tanto, por ejemplo, los compuestos de esta invención pueden usarse para tratar cualquier afección en un mamífero en la que haya necesidad de plaquetas o megacariocitos. Dichas afecciones se describen con detalle en las siguientes fuentes ejemplares: WO95/26746, WO95/21919, WO95/18858 y WO95/21920.

Los compuestos de TMP de esta invención pueden ser también útiles para mantener la viabilidad o periodo de almacenamiento de las plaquetas y/o megacariocitos y células relacionadas. Por consiguiente, podría ser útil incluir una cantidad eficaz de uno o más de dichos compuestos en una composición que contenga dichas células.

25 Los métodos terapéuticos, composiciones y compuestos de la presente invención pueden emplearse también, solos o en combinación con otras citocinas, receptores de Mpl solubles, factores hematopoyéticos, interleucinas, factores de crecimiento o anticuerpos en el tratamiento de estados patológicos caracterizados por otros síntomas además de deficiencias de plaquetas. Se prevé que el compuesto de la invención se probará útil en el tratamiento de algunas formas de trombocitopenia en combinación con estimulantes generales de la hematopoyesis, tales como IL-3 o GM-CSF. Pueden emplearse también con el ligando de Mpl otros factores estimulantes de megacariocitos, concretamente, meg-CSF, factor de citoblastos (SCF), factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM) u otras moléculas con actividad estimulante de megacariocitos. Las citocinas o factores hematopoyéticos ejemplares adicionales para dicha coadministración incluyen IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), SCF, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón α (IFN- α), interferón de consenso, IFN- β o IFN- γ . Puede ser adicionalmente útil administrar, simultánea o secuencialmente, una cantidad eficaz de un receptor soluble de Mpl de mamífero, que parece tener el efecto de causar que los megacariocitos se fragmenten en plaquetas una vez los megacariocitos han alcanzado la forma madura. Por tanto, la administración de un compuesto de la invención (para potenciar el número de megacariocitos maduros) seguido de la administración del receptor soluble de Mpl (para inactivar el ligando y permitir que los megacariocitos maduros produzcan plaquetas) se espera que sea un medio particularmente eficaz de estimular la producción de plaquetas. Se ajustaría la dosificación apropiada para compensar dichos componentes adicionales en la composición terapéutica. La progresión del paciente tratado puede monitorizarse mediante métodos convencionales.

45 En diabetes sacarina no insulino dependiente (DSNID), también conocida como pacientes diabéticos de tipo 2, la administración de péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) tiene propiedades antidiabéticas. Sin embargo, el GLP-1 se degrada rápidamente por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) después de su liberación *in vivo*. Por tanto, es una ventaja de la presente invención que pueda fusionarse un péptido GLP-1 o variante del mismo con un polipéptido TTR de la invención para estabilizar el GLP-1 y aumentar su semivida *in vivo*. Por consiguiente, en otra realización de la invención, puede usarse una proteína de fusión TTR-GLP1 como se describe en la presente memoria para tratar afecciones conocidas generalmente por implicar diabetes sacarina no insulino dependiente (DSNID), que es también conocida como diabetes de tipo II.

50 Un experto en la técnica reconocerá que la secuencia de un péptido GLP-1 puede variar de tal modo que mantenga sus efectos insulino trópicos. Los ejemplos particulares de dichas variaciones conocidas en la materia incluyen, por ejemplo, GLP-1 (7-34), (7-35), (7-36) o (7-37); Gln⁹-GLP-1 (7-37), D-Gln⁹-GLP-1 (7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37) y Lys¹⁸-GLP-1 (7-37). Se describen ejemplos adicionales de variantes de GLP-1 en las patentes de EE.UU. nº 5.118.666, 5.545.618, 5.977.071, el documento WOO2/46227 y en Adelhorst *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 6275 (1994).

Por consiguiente, puede usarse cualquier péptido GLP-1 para generar proteínas de fusión de la invención, a condición de que la proteína de fusión de GLP-1 sea capaz de unirse a e inducir una señal a través de su receptor

asociado. Puede medirse la unión y activación del receptor mediante ensayos estándares (patente de EE.UU. nº 5.120.712).

5 La dosis de proteína de fusión eficaz para normalizar la glucosa sanguínea de un paciente dependerá de una serie de factores entre los que se incluyen el peso y edad del sujeto, la gravedad de su incapacidad para regular la glucosa sanguínea, la vía de administración, la biodisponibilidad, el perfil farmacocinético de la proteína de fusión y la formulación como se discute más detalladamente a continuación.

10 Los métodos terapéuticos, composiciones y compuestos de la presente invención pueden emplearse también, solos o en combinación con otros tratamientos para la diabetes incluyendo insulina e inhibidores de DPP-IV. La dosificación de la proteína de fusión de GLP-1 se ajustaría para compensar dichos componentes adicionales en la composición terapéutica. La progresión del paciente tratado puede monitorizarse mediante métodos convencionales tales como, por ejemplo, la monitorización de los niveles sanguíneos de glucosa.

15 La presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas de los compuestos de la invención. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser para administración por inyección o para administración oral, nasal, transdérmica u otras formas incluyendo, por ejemplo, por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar (por ejemplo, fármacos aerosolizados) o subcutánea (incluyendo administración retardada para liberación a largo plazo); sublingual, anal, vaginal o por implante quirúrgico, por ejemplo insertado bajo la cápsula esplénica, cerebro o en la córnea. El tratamiento puede consistir en una sola dosis o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo. En general, se incluyen en la invención las composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de un compuesto de la invención
20 junto con diluyentes, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, coadyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato, citrato, etc.), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween-80, polisorbato 80, etc.), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, tiomersal, alcohol bencílico) y sustancias voluminizantes (por ejemplo, lactosa, manitol) y la incorporación del material a preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc. o a liposomas. Puede usarse también ácido hialurónico, y este puede tener el efecto de promover una duración prolongada de la circulación. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir opcionalmente
25 otros diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables que sirven como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos, incluyendo monolaurato de polioxietilensorbitán, estearato de magnesio, hidroxibenzoato de metilo y propilo, almidones, sacarosa, dextrosa, goma arábiga, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao, y aceite de teobroma. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y excreción *in vivo* de las presentes proteínas y derivados. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co.; Easton; PA 18042), páginas 1435-1712.

35 Las composiciones pueden prepararse en forma líquida o pueden estar en polvo seco, tal como en forma liofilizada. Las formulaciones de liberación prolongada implantables están también contempladas, así como las formulaciones transdérmicas.

40 Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. El fármaco podría incorporarse a una matriz inerte que permita la liberación por mecanismos de difusión o lixiviación, por ejemplo gomas. Pueden incorporarse también matrices de degeneración lenta a la formulación, por ejemplo, alginatos y polisacáridos. Otra forma de liberación controlada de este producto terapéutico es mediante un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), concretamente el fármaco se encierra en una membrana semipermeable que permite entrar el agua y empuja fuera el fármaco a través de una sola abertura pequeña debido a efectos osmóticos. Algunos recubrimientos entéricos tienen también un efecto de liberación prolongada.

45 Se contempla también el suministro pulmonar de la presente proteína (o derivados de la misma). La proteína (o derivado) se suministra a los pulmones de un mamífero por inhalación y atraviesa el revestimiento epitelial pulmonar hasta la corriente sanguínea. (Otros informes de esto incluyen Adjei *et al.*, Pharmaceutical Research 7: 565-569 (1990); Adjei *et al.*, International Journal of Pharmaceutics 63: 135-144 (1990) (acetato de leuprolida); Braquet *et al.*, Journal of Cardiovascular Pharmacology 13 (supl.5): s. 143-146 (1989) (endotelina 1); Hubbard *et al.*, Annals of Internal Medicine 3: 206-212 (1989) (1-antitripsina); Smith *et al.*, J. Clin. Invest. 84: 1145-1146 (1989) (1-proteinasa); Oswein *et al.*, "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, marzo de 1990 (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs *et al.*, The Journal of Immunology 140: 3482-3488 (1988) (interferón y factor de necrosis tumoral) y Platz *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos).

55 Se contemplan para uso en la práctica de esta invención un amplio intervalo de dispositivos mecánicos diseñados para el suministro pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo nebulizadores, inhaladores de dosis medida e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la técnica.

56 Son algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de esta invención el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II,

fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin, comercializado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

5 Todos dichos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para dispensar el compuesto de la invención. Típicamente, cada formulación es específica del tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propelente apropiado, además de diluyentes, coadyuvantes y/o portadores útiles en terapia.

El compuesto de la invención debería prepararse lo más ventajosamente en forma particulada con un tamaño medio de partícula de menos de 10 μm (o micrómetros), lo más preferiblemente de 0,5 a 5 μm , para un suministro más eficaz al pulmón distal.

10 Los portadores incluyen carbohidratos tales como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros ingredientes para uso en las formulaciones pueden incluir DPPC, DOPE, DSPC y DOPC. Pueden usarse tensoactivos naturales o sintéticos. Puede usarse polietilenglicol (incluso aparte de su uso en la derivatización de proteína o análogo). Pueden usarse dextranos, tales como ciclodextrano. Pueden usarse sales biliares y otros potenciadores relacionados. Pueden usarse celulosa y derivados de celulosa. Pueden usarse aminoácidos, tales como el uso en una formulación de tampón.

15 El régimen de dosificación implicado en un método para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas se determinará por el facultativo a cargo, considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el momento de administración y otros factores clínicos. Generalmente, la dosis debería estar en el intervalo de 0,1 μg a 100 mg del compuesto de la invención por kg de peso corporal al día, preferiblemente de 0,1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; y más preferiblemente de 0,1 a 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, administrados en dosis diarias o en dosis equivalentes a intervalos más largos o más cortos, por ejemplo, cada dos días, dos veces por semana o dos o tres veces al día.

20 Los compuestos de la invención pueden administrarse mediante una inyección en bolo inicial seguida de una infusión continua para mantener los niveles terapéuticos en circulación del producto farmacológico. Como otro ejemplo, los compuestos de la invención pueden administrarse como una dosis por vez. Los expertos en la técnica optimizarán fácilmente las dosificaciones eficaces y los regímenes de administración, como se determinan por una buena práctica médica y la condición clínica del paciente individual. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y de la vía de administración. La formulación farmacéutica óptima se determinará por un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y de la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18^a Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), páginas 1435-1712.

Dependiendo de la vía de administración, puede calcularse una dosis adecuada según el peso corporal, área superficial corporal o tamaño de órgano.

35 Las dosificaciones apropiadas pueden establecerse mediante el uso de ensayos reconocidos para determinar los niveles séricos junto con los datos de dosis-respuesta apropiados. El régimen de dosificación final se determinará por el facultativo a cargo considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la sensibilidad del paciente, edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el momento de administración y otros factores clínicos. A medida que se realizan los estudios, surgirá información adicional respecto a los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento para diversas enfermedades y afecciones.

40 Los siguientes ejemplos se pretenden solo para ilustración, y no debería considerarse que limiten la invención en modo alguno.

Ejemplo 1

45 Este ejemplo describe la preparación de ADN para transtiretina humana recombinante nativa (TTR) y las siguientes variantes de TTR: TTR(C10A), TTR(C10A/A37C), TTR(C10A/D38C), TTR(C10A/A81C), TTR(C10A/G83C), y TTR(C10A/K15A/G83C).

50 El plásmido de expresión pAMG21 está disponible en la ATCC con el número de acceso 98113, que se depositó el 24 de julio de 1996 (véase el documento PCT WO 97/23614, publicado el 3 de julio de 1997 para una descripción del pAMG21). Se dispuso la secuencia de ADN que codifica TTR, variantes de TTR o fusiones de TTR-péptido bajo el control del promotor LuxPR en pAMG21.

55 El hospedador bacteriano GM221 es una cepa K-12 de *E. coli* que se ha modificado para contener tanto el represor λ sensible a la temperatura cl857s7 en la región temprana *ebg* como el represor *lacI*^o en la región tardía *ebg* (68 minutos). La presencia de estos dos genes represores permite el uso de este hospedador con una variedad de sistemas de expresión, aunque ambos represores son irrelevantes para la expresión de luxP_R. El hospedador no transformado no tiene resistencias a antibióticos. El sitio de unión a ribosoma del gen cl857s7 se ha modificado para incluir un RBS potenciado. Se ha insertado en el operón *ebg* entre las posiciones nucleotídicas 1170 y 1411 como se

numeran en el número de acceso a Genbank M64441Gb_Ba, con delección de la secuencia de *ebg* intermedia. Se suministró el constructo al cromosoma usando un fago recombinante llamado MMe_{ebg}-cl857s7 con RBS potenciado nº 4 en F^{tet}/393. Después de recombinación y resolución, solo permanece en la célula el inserto cromosómico descrito anteriormente. Se renombró F^{tet}/GM101. Se modificó entonces F^{tet}/GM101 mediante el suministro de un constructo de lacI^o en el operón *ebg* entre las posiciones nucleotídicas 2493 y 2937 como se numeran en el número de acceso a Genbank M64441Gb_Ba, con delección de la secuencia de *ebg* intermedia. Se suministró el constructo al cromosoma usando un fago recombinante llamado AGE_{ebg}-lacI^o nº5 en F^{tet}/GM101. Después de recombinación y resolución, solo permanece en la célula el inserto cromosómico descrito anteriormente. Se renombró F^{tet}/GM221. Se curó el episoma de F^{tet} de la cepa usando naranja de acridina a una concentración de 25 µg/ml en LB. Se identificó la cepa curada como sensible a tetraciclina y se almacenó como GM221.

Se sintetizaron oligonucleótidos (1,0 nM cada uno) mediante el método de fosforamidita. Se alteraron los nucleótidos, en algunos casos, para una expresión optimizada en *E. coli*. Estos cambios de codón no dieron como resultado cambios en la secuencia aminoacídica. Cada uno de los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo se enumera en la Tabla 1.

Se efectuó la PCR con polimerasa Expand Long según el protocolo del fabricante (Boehringer Mannheim). Se verificaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificaron y digirieron con NdeI y XhoI (New England Biolabs). Se digirió el vector de expresión pAMG21 de la misma manera y se trató entonces con fosfatasa intestinal de ternero (Boehringer Mannheim). Se purificaron vector e inserto en un gel de agarosa, se mezclaron entonces y se ligaron con una ADN ligasa T4 (New England Biolabs). Se realizó el ligamiento a 4°C durante 2 h. Se transformó cada mezcla de ligamiento mediante electroporación en la cepa hospedadora GM221 descrita anteriormente con un Biorad GenePulser (Biorad Laboratories) usando 2,5 V, 25 µFD y 200 ohmios en una cubeta con una longitud de hueco de aproximadamente 2 mm. Después de la electroporación, se dejaron recuperar las células en 1 ml de calcio Luria (LB) durante aproximadamente 1 hora a 37°C con agitación suave. Se sembró toda la mezcla de transformación en agar LB que contenía kanamicina 50 µg/ml. Se cribó en las colonias la presencia del peso molecular deseado por PCR usando oligonucleótidos dirigidos contra la secuencia del vector flanqueante. Se evaluaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Se cribó adicionalmente en los clones positivos la capacidad de producir el producto proteico recombinante y se verificó finalmente mediante secuenciación nucleotídica.

Las secuencias de ADN y aminoacídica de la TTR son conocidas (Mita, S *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 124 (2), 558-564 [1984]). Estas secuencias se han depositado en Genbank con el número de acceso K02091. Se clonó el ADNc de TTR nativa excluyendo el péptido señal de una colección de ADNc derivada de hígado humano (Clontech). Se sintetizaron específicamente un oligonucleótido que codifica ocho codones del extremo 5' de TTR (oligo 2693-79) y un oligonucleótido que codifica siete codones del extremo 3' de TTR, incluyendo un codón de terminación (oligo 2693-80) y se usaron para amplificar la TTR madura completa con polimerasa Expand Long usando una colección de ADNc de hígado humano como molde. Se digirió el fragmento de PCR resultante con NdeI y XhoI, se purificó en gel y se ligó con el vector de expresión pAMG21 restringido con NdeI/XhoI. Después de 2 horas a 4°C, se electroporó la mezcla de ligamiento en células GM221. Se escogieron colonias individuales y se preparó el secuenció el ADN plasmídico. Se mostró que un plásmido resultante (cepa nº 5316) tiene la secuencia de ADN correcta de la TTR nativa (más una metionina en el extremo N) y se usó para expresión. Esta secuencia de ADN se identifica como SEQ ID NO:2.

Se preparó la TTR(C10A) mutante usando el oligonucleótido 2693-80 anterior y el oligonucleótido 2820-88 (incluye los 11 primeros codones de la TTR nativa en que el codón Cys en la posición 10 se cambió a Ala). El procedimiento de PCR y el proceso de selección de la cepa de expresión fueron similares a los descritos anteriormente. La cepa resultante (cepa nº 5619) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:3.

Se modificó adicionalmente el plásmido 5619 reemplazando los aminoácidos en las siguientes posiciones: A37, D38, A81 y G83, por el aminoácido cisteína. Como se describe a continuación, se usó cada par de oligonucleótidos complementarios que albergan las mutaciones deseadas junto con los cebadores 5' y 3' de TTR descritos anteriormente en un procedimiento de PCR de dos etapas estándar diseñado para mutagénesis específica de sitio. Se usó cada uno de los cebadores de codificación con un cebador 3' de TTR y se usó cada uno de los cebadores inversos con un cebador 5' de TTR en una PCR de 20 ciclos en que se usó el plásmido derivado de la cepa 5619 como molde. La PCR resultante amplificó los fragmentos 5' y 3', se mezclaron y se usaron como molde para la segunda etapa de PCR, generando mutantes completos. Los procedimientos de clonación y secuenciación posteriores fueron similares a los ya descritos. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: TTR(A37C) de codificación (oligo 2823-91); TTR(A37C) inverso (oligo 2823-3092); TTR(D38C) de codificación (oligo 2823-93); TTR(D38C) inverso (oligo 2823-94); TTR(A81C) de codificación (oligo 282395); TTR(A81C) inverso (oligo 2823-96); TTR(G83C) de codificación (oligo 2823-97); TTR(G83C) inverso (oligo 282398). Las cepas de *E. coli* resultantes que contienen los plásmidos se describen como sigue: TTR(C10A/A37C) (cepa 5641) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:4. TTR(C10A/D38C) (cepa 5642) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:5. TTR(C10A/A81C) (cepa 5643) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:6. TTR(C10A/G83C) (cepa 5651) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:7.

ES 2 400 341 T3

La Lys en la posición 15 de la cepa 5651 se mutagenizó adicionalmente a Ala usando los oligonucleótidos 2953-67 y 2953-68 mediante un procedimiento similar al descrito para las cepas 5641, 5642, 5643 y 5651. La cepa resultante, TTR(C10A/K15A/G83C) (cepa 5895) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:8.

Tabla 1

Oligo	Secuencia	Número de ID SEQ
2693-79	GAGGAATAACATATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAA	18
2693-80	CCGCGGATCCTCGAGATTATTCCTTGGGATTGGTGA	19
2820-88	GAGGAATAACATATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAA TCCAAGGCTCCT	20
2823-91	AGAAAGGCTTGTGATGACACCTGG	21
2823-92	CCAGGTGTCATCACAAGCCTTTCT	22
2823-93	AGAAAGGCTGCTTGTGACACCTGG	23
2823-94	CCAGGTGTCACAAGCAGCCTTTCT	24
2823-95	TACTGGAAGTGTCTTGGCATCTCC	25
2823-96	GGAGATGCCAAGACACTTCCAGTA	26
2823-97	AAGGCACTTTGCATCTCCCCATTC	27
2823-98	GAATGGGGAGATGCAAAGTGCCCTT	28
2953-67	CTGATGGTGCAGTTCTAGAT	29
2953-68	ATCTAGAAGTGCAGCCATCAG	30

5 Ejemplo 2

Este ejemplo describe la preparación de diversas fusiones de TMP-TTR. Se prepararon varias proteínas de fusión que contenían TTR y TMP. Cada uno de los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo se enumera en la Tabla 2.

Se amplificó en primer lugar un fragmento que contiene TMP de una cepa que alberga un plásmido que codifica una fusión TMP-Fc completa (véase la publicación PCT n° 00/24770) usando los oligonucleótidos 2743-96, que codifica los 7 primeros codones de TMP más una extensión 5' de 12 nucleótidos que incluye un sitio NdeI, y 2743-97, que codifica los 7 primeros codones de TTR nativa y los 7 últimos codones del TMP de interés. Se mezcló el fragmento de PCR resultante con plásmido derivado de la cepa 5619 y se usó la mezcla como molde para los cebadores oligonucleotídicos 2743-96 y 2693-80, para amplificar la TMP-TTR completa. Se usaron procedimientos similares a los descritos anteriormente para clonación y expresión. La cepa resultante, TMP-TTR (cepa 5513), tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:9.

Se introdujo entonces el TMP en el extremo N de las cepas 5641, 5642, 5643 y 5651, respectivamente. Se digirió el plásmido 5513 con XbaI, se purificó en gel del inserto de XbaI/XbaI resultante que contenía el TMP y los 18 primeros codones de TTR(C10A) y se ligó con el vector restringido con XbaI, tratado con fosfatasa y purificado en gel derivado de 5641, 5642, 5643 y 5651. Se efectuó la secuenciación de ADN para seleccionar la orientación correcta para cada fusión. Las cepas de *E. coli* resultantes que contienen los plásmidos se describen como sigue: TMP-TTR(C10A/A37C) (cepa 5704) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:10. TMP-TTR(C10A/D38C) (cepa 5705) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:11. TMP-TTR(C10A/A81C) (cepa 5706) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:12. TMP-TTR(C10A/G83C) (cepa 5707) tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:13.

Tabla 2

Oligo	Secuencia	Número de ID SEQ
2743-96	GAGGAATAACATATGATCGAAGGTCCGACTCTGCGT	31
2743-97	TTCACCGGTACCAGTTGGACCTGCGCTGCTGCAAG CCATT	32

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la preparación de la fusión PTH(1-34)-TTR(C10A/K15A/G83C). Cada uno de los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo se enumera en la Tabla 3.

Se sintetizaron dos nuevos oligonucleótidos, el oligonucleótido 2694-01, que codifica los 7 primeros codones de PTH humana, y el oligonucleótido 2694-03, que codifica los 7 primeros codones de TTR y los aminoácidos 28-34 de PTH, para preparar la fusión. Se usaron los oligonucleótidos 2694-01 y 2694-03 en un procedimiento de PCR de 20 ciclos como se describe anteriormente para amplificar PTH(1-34) con el ligador de TTR. El molde para esta reacción era una cepa que alberga un plásmido que codifica una fusión de PTH1-34-Fc (véase la publicación PCT n° 01/81415). Se combinó la mezcla de PCR resultante con la cepa 5895 y se usó como molde para amplificar la PTH(1-34)TTR(C10A/K15A/G83C) completa usando los cebadores 2694-01 y 2693-80. Después de la confirmación de secuencia, se designó la cepa de expresión resultante que contenía el nuevo plásmido como PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) (cepa 5920) y tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ 1D NO:14.

Tabla 3

Oligo	Secuencia	Número de ID SEQ
2694-01	GAGGAATAACATATGTCTGTTTCTGAAATCCAG	33
2694-03	TTCACCGGTACCAGTTGGACCAAAGTTATGAACGTC	34

Ejemplo 4

Este ejemplo describe la preparación de una fusión de 1L-1ra-TTR(C10A) y una fusión de TTR(C10A)-GSGS-1L-1ra. Cada uno de los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo se enumera en la Tabla 4.

Para preparar la fusión de 1L-1ra-TTR(C10A), se sintetizaron dos oligonucleótidos, el oligonucleótido 2823-13 que codifica los 7 primeros codones de la proteína IL-1ra humana, y el oligonucleótido 2823-14, que codifica los 7 últimos aminoácidos de IL-1ra y los 7 primeros aminoácidos de TTR. Se amplificó el plásmido derivado de una cepa que expresa IL-1ra (véase la publicación PCT n° 91/08285) usando los oligonucleótidos 2823-13 y 2823-14. Se mezcló el producto de PCR resultante con plásmido purificado de la cepa 5619 y se usó como molde para amplificar la IL-1ra-TTR(C10A) completa usando los cebadores oligonucleotídicos 2823-13 y 2693-80. Se clonó el producto de PCR, se secuenció y se expresó como se describe anteriormente. La cepa resultante que contiene el nuevo plásmido se designó IL-1ra-TTR(C10A) (cepa 5644) y tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:15.

Para preparar TTR(C10A)-IL-1ra, se sintetizaron los dos oligonucleótidos siguientes, el oligonucleótido 2787-32 que codifica los 7 últimos aminoácidos de TTR, los 7 primeros aminoácidos de IL-1ra entre los que se introdujo un ligador GSGS, y el oligonucleótido 2787-33, que codifica los 7 últimos codones de IL-1ra. Se usaron estos dos cebadores oligonucleotídicos para amplificar el plásmido 2693, se mezcló el producto de PCR resultante con el plásmido 5619 y se usaron conjuntamente estos como molde para amplificar la TTR(C10A)-IL-1ra completa usando los cebadores 2787-33 y 2693-79. Se clonó el producto de PCR, se secuenció y se expresó como se describe anteriormente. La cepa resultante que contiene el nuevo plásmido se designó TTR(C10A)-IL-1ra (cepa 5645) y tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:16.

Tabla 4

Oligo	Secuencia	Número de ID SEQ
2823-13	GAGGAATAACATATGCGACCGTCCGGACGTAA	35
2823-14	TTCTACTTCCAGGAAGACGAAGGTCCAACTGGTACC	36
2787-32	GTCGTCACCAATCCCAAGGAAGGTAGTGGTAGCCGA CCGTCCGGCCGTAAGAGC	37
2787-33	CCGCGGATCCTCGAGATTATTCGTCTTCTGGAAGT AGAA	38

Ejemplo 5

Este ejemplo describe la preparación de TTR(C10A/G83C)-bradicinina. Cada uno de los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo se enumera en la Tabla 5.

Se usó el plásmido purificado de la cepa 5651 para PCR con el cebador oligonucleotídico 2693-79 y el cebador oligonucleotídico 2943-47, que es un cebador 3' de TTR que contiene un sitio de restricción PstI. Se purificó en gel este producto de PCR y se sometió a digestión de restricción con NdeI y PstI. Se usó el fragmento de ADN resultante en una mezcla de ligamiento que contenía AMG21, digerido con NdeI y XhoI, y los ligadores oligonucleotídicos asociados 2943-48, que codifica el ligador GSGSG, y 2943-49, que codifica el péptido antagonista de bradicinina KRPPGFSP con extremos superpuestos PstI 5' y XhoI 3'. Se transformó GM121 con este producto de ligamiento y se purificó el ADN de las colonias resistentes a kanamicina. Se confirmó entonces la secuencia de ADN en las colonias resistentes. Se cultivó la cepa confirmada a 30°C y se indujo la expresión en una fermentación

de 10 l descrita a continuación. La nueva cepa se designó como TTR(C10A/G83C)-bradicinina (cepa 5914) y tenía la secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO:17.

Tabla 5

Oligo	Secuencia	Número de ID SEQ
2693-79	GAGGAATAACATATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAA	39
2943-47	AATATACTGCAGTGGTGGGAATAGGAG	40
2943-48	GTCGTCACCAATCCCAAGGAAGGATCAGGATCCGGA AAACGTCCGCCGGGTTCTCCCCGCTGTAATC	41
2943-49	TCGAGATTACAGCGGGGAGAAACCCGGCGGACGTTTT CCGATCCTGATCCTTCTGGGATTGGTGACGACTGCA	42

Ejemplo 6

5 Este ejemplo describe la expresión recombinante de constructos de TTR y fusión de TTR en *E. coli*. En cada una de las TTR o fusiones de TTR recién construidas se examinó en primer lugar la expresión soluble a temperaturas en el intervalo de 16°C a 37°C. Con este fin, se cultivaron cultivos (25 ml) de GM221 que expresan cada una de las TTR o fusiones de TTR en medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml a 37°C hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm alcanzó de 0,5 a 1,0. Se dispusieron entonces los cultivos en agitadores con ajustes de temperatura a 16°C, 20°C, 25°C, 30°C, 34°C y 37°C, respectivamente. Se consiguió la inducción de la expresión del producto génico del promotor luxPR después de la adición del autoinductor sintético *N*-(3-oxohexanoil)-DL-homoserinalactona al medio de cultivo a una concentración final de 20 ng/ml. Después de 6 horas, se examinó en los cultivos bacterianos por microscopía la presencia de cuerpos de inclusión. Pudo conseguirse a menudo una expresión soluble o parcialmente soluble cultivando los cultivos a temperaturas menores de 30°C para TTR y sus fusiones, y se usó esta temperatura para expresión a gran escala. En los casos en que no pudo conseguirse expresión soluble, se usaron las temperaturas a las que el nivel de expresión era máximo para agitadores o fermentadores a gran escala.

La expresión a gran escala se realizó normalmente en matraces de 4 l. Se inocularon de 4 a 8 agitadores de 4 l que contenían 1 l de LB con cultivos de una noche de TTR o sus cepas de fusión. Se realizó la expresión esencialmente como se describe anteriormente. Se recogieron las células mediante centrifugación.

20 La etapa de fermentación, que emplea una técnica aséptica, empieza con la inoculación de un cultivo de semilla de cepas producidas en un matraz agitado que contiene 500 ml de caldo Luria esterilizado. Cuando este cultivo obtenía la densidad celular apropiada (0,8-2 a 600 nm), se usaron los contenidos para inocular un fermentador de 20 l que contenía 10 l de medio de crecimiento basado en complejo. Se mantiene el fermentador a 30°C y pH 7 con niveles de oxígeno disuelto mantenidos a un 30% de saturación. Cuando la densidad celular alcanzó una densidad óptica de 10-12 unidades de DO a 600 nm, en dicho punto se indujo el cultivo mediante la adición de *N*-(3-oxohexanoil) homoserinalactona. A las 6 horas después de la inducción, se recogieron las células del fermentador mediante centrifugación.

Ejemplo 7

30 Este ejemplo describe la purificación de TTR(C10A/G83C)-bradicinina. Se descongelaron aproximadamente 193 g de pasta de *E. coli* del clon 5914 almacenada a -80°C en 1447 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0. Se disolvieron 50 comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa de Sigma 1-873-580 (Saint Louis, MO) en la suspensión celular y se pasó la suspensión a través de un microfluidificador de modelo 110-Y (Microfluidics, Newton, MA) dos veces a 82,7 MPa. Se centrifugó el lisado (Figura 1, carril 2) a 11.325 x g durante 50 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante como fracción soluble. Se calentó la fracción soluble en un baño de agua a 65°C durante 30 minutos en frascos de polipropileno, en cuyo momento la temperatura del contenido era de 63°C. Se centrifugó la fracción soluble a 11.325 x g durante 50 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante como termosoluble (Figura 1, carril 3). Se filtró la fracción termosoluble a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm con dos prefiltros y se cargó entonces en una columna Q-Sepharose Fast Flow de 240 ml (5 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 20 ml/min equilibrada con tampón Q A (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Se lavó la columna con aproximadamente 2300 ml de tampón Q A a 20 ml/min. Se eluyó la columna Q con 15 volúmenes de columna de gradiente lineal de 60% de tampón Q B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,0), seguido de una etapa de 2 volúmenes de columna de 100% de tampón Q B. Se agruparon las fracciones que contenían la fusión de TTR determinadas por PAGE-SDS en un solo agrupamiento Q (1150 ml) (Figura 1, carril 4) y se añadieron 1,77 g de DTT. Se agitó suavemente el agrupamiento Q durante 30 min a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Se añadieron lentamente al agrupamiento Q 410 ml de sulfato de amonio 3,8 M a pH 7,0 y se redujo el pH de aproximadamente 7,5 a 7,0 mediante la adición lenta de HCl 1 M. Se cargó entonces aproximadamente la mitad del agrupamiento Q en una columna de fenil-Sepharose de alta resolución de 84 ml (2,6 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech) en tampón P A (NaH₂PO₄ 50 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 7,0) a 10 ml/min. Se lavó la columna con aproximadamente 170 ml de tampón P A seguido de eluciones en tres etapas usando 50%, 80% y 100% de tampón P B (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0). Se procesó entonces

la mitad restante del agrupamiento Q usando el mismo protocolo que la primera mitad. Se agruparon las fracciones que contenían la fusión de TTR determinadas por PAGE-SDS en un solo agrupamiento P (260 ml) (Figura 1, carril 5) y se dializó el agrupamiento P frente a 4 l de tampón HA A (NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,0) durante 2 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) usando conductos de diálisis de 8 kDa de corte de 20,4 mm de diámetro (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Domínguez, CA). Se cambió el tampón de diálisis por 4 l de tampón HA A reciente y se continuó la diálisis durante aproximadamente 15 horas adicionales. Se retiró el agrupamiento P de la diálisis y se añadieron 600 μl de DTT 1 M seguido de incubación a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) durante aproximadamente 1 hora. Se cargó el agrupamiento P en una columna de hidroxiapatito cerámico de tipo 1 de 105 ml (2,6 cm) (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) a 10 ml/min en tampón HA A. Se lavó la columna con aproximadamente 210 ml de tampón HA A a 10 ml/min, seguido de 4 etapas de 12,5%, 25%, 50% y 100% de tampón HA B (NaH_2PO_4 400 mM, pH 7,0). Se combinó el flujo como agrupamiento HA (340 ml) (Figura 1, carril 6) y se añadieron 524 mg de DTT seguido de incubación a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) durante 1 hora.

Se cargó aproximadamente la mitad del agrupamiento HA en una columna Source 15Q de 47 ml (2,6 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech) a 10 ml/min seguido de un lavado con aproximadamente 250 ml de tampón Q A. Se eluyó la columna con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de 10 a 50% de tampón Q B seguido de una etapa de 2 volúmenes de columna de 100% de tampón Q B. Se procesó entonces la mitad restante del agrupamiento HA usando el mismo protocolo que la primera mitad. Se agruparon las fracciones que contenían la fusión de TTR determinadas por PAGE-SDS en un solo agrupamiento Q2 (260 ml) y se concentraron a aproximadamente 75 ml usando una célula agitada con una membrana de 10 kDa. Se filtró entonces el agrupamiento Q2 (Figura 1, carril 7) a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 μm y se determinó que la concentración de proteína era de 16,9 mg/ml usando un coeficiente de extinción calculado de $18.450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se determinó que el nivel de pirógenos era $<1 \text{ UE/mg}$ de proteína usando el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Se determinó que el contenido de ácido nucleico era despreciable, puesto que se determinó que la relación de absorbancia a 260 nm frente a 280 nm era de 0,52.

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra que fusionar un péptido con el extremo C o extremo N de TTR(C10A/G83C) no tiene un impacto significativo sobre su estructura oligomérica. Se redujeron TTR(C10A/G83C), PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) y TTR(C10A/G83C)-bradisinina en Tris 20 mM, pH 8,0 y NaCl aproximadamente 250 mM con DTT 9 mM durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Se inyectaron aproximadamente 50 μg de la TTR reducida en una columna Biosep-Sec-S 3000 (7,8 mm de DI x X 300 mm) (Phenomenex, Torrance, CA) en tampón SEC (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, pH 6,7) a 1 ml/min. Se usaron patrones de peso molecular de Bio-Rad (151-1901) para calibrar la columna y calcular el tamaño molecular aproximado de las muestras inyectadas. Como puede observarse en la Figura 2, la TTR(C10A/G83C) eluía aproximadamente a los 8,8 minutos correspondiendo a un tamaño molecular de 49 kDa, que es comparable con el peso molecular calculado del tetrámero de 55 kDa. La PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) eluía aproximadamente a los 8,6 min correspondiendo a un tamaño molecular de 67 kDa, que es cercano al calculado de 71 kDa para el tetrámero. La TTR(C10A/G83C)-bradisinina eluía aproximadamente a los 8,7 min correspondiendo a un tamaño molecular de 57 kDa, que es también cercano al calculado de 60 kDa para el tetrámero.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra que fusionar una proteína que contiene enlaces disulfuro con el extremo C o el extremo N de TTR(C10A) no tiene un impacto significativo sobre su estructura oligomérica. Se inyectaron aproximadamente 50 μg de cada una de TTR(C10A), IL-1ra-TTR(C10A) y TTR(C10A)-IL-1ra en una columna Biosep-Sec-S 3000 (7,8 mm de DI X 300 mm) (Phenomenex) en tampón SEC a 1 ml/min. Se usaron patrones de peso molecular de Bio-Rad (151-1901) para calibrar la columna y calcular el peso molecular aproximado de las muestras inyectadas. Como puede observarse en la Figura 3, la TTR(C10A) eluye aproximadamente a los 8,8 min, que corresponde a un tamaño molecular de 49 kDa que es comparable con el peso molecular calculado del tetrámero de 55 kDa. La fusión IL-1ra-TTR(C10A) eluía aproximadamente a los 7,9 min, correspondiente a un tamaño molecular de 188 kDa, que es notablemente mayor que el esperado para el tetrámero de 124 kDa. De forma similar, la TTR(C10A)-IL-1ra eluía aproximadamente a los 7,9 min, correspondiendo de nuevo a un tamaño molecular de 188 kDa en comparación con los 124 kDa esperados para el tetrámero. Estas discrepancias de tamaño son probablemente debidas a la forma de la molécula, puesto que la cromatografía de exclusión por tamaño depende de la forma y los patrones se calibran para proteínas globulares.

Ejemplo 10

Este ejemplo compara la unión de una secuencia de TMP fusionada con el extremo carboxilo de Fc de inmunoglobulina humana (Fc-TMP) y TMP(m)-TTR con receptor soluble de leucemia mieloproliferativa (MPL) humana. Además, este ejemplo muestra el efecto de la pegilación de la cisteína de TTR nativa sobre la unión de la fusión de TMP con el receptor de MPL. La preparación de las fusiones de TTR pegiladas se describe con detalle en el Ejemplo 13.

Para este ejemplo, se unió covalentemente el receptor de MPL humana con un chip CM5 de BIAcore a $R_L = 1300 R_U$ usando la química de EDC/NHS según las instrucciones del fabricante (BIAcore, Uppsala, Suecia). Se pasaron todas las muestras por el chip a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ en PBS de Dulbecco (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) con seroalbúmina bovina 0,1 mg/ml y 0,005% de P20 (polioxietilensorbitán). Se tomó el criterio de valoración de equilibrio 3 min después de la inyección. Como puede observarse en la Figura 4, la Fc-TMP muestra características de unión superiores en comparación con TMP(m)-TTR. Adicionalmente, esta figura demuestra que la pegilación de la cisteína de TTR nativa (Cys10) interfiere con la unión de TMP al receptor de MPL. La unión de TMP(m)-TTR-PEG 5K mostró una respuesta de unión significativamente reprimida en comparación con su contrapartida no pegilada, y la TMP(m)-TTR-PEG 20K mostró una inhibición aún mayor. Esto indica que la presencia de PEG en la cisteína 10 causa probablemente interferencia estérica para la unión de TMP fusionado con el receptor de MPL, y los PEG mayores producen más interferencia.

Ejemplo 11

Este ejemplo muestra el efecto de inyectar TMP(m)-TTR en ratones sobre el recuento de plaquetas sanguíneas. Para este ejemplo, se repartieron 50 ratones BDF1 (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) en 5 grupos y se les inyectó (día 0) por vía subcutánea agente diluyente (PBS de Dulbecco con seroalbúmina bovina al 0,1%) o agente diluyente con 50 μg de proteína de ensayo por kg de animal. Se dividió cada grupo en dos mitades y se extrajo sangre (140 μl) en puntos temporales alternados (días 0, 3, 5, 7, 11, 12, 14 y 17). Se anestesiaron los ratones con isoflurano antes de la recogida.

Se analizó en la sangre recogida un recuento completo y diferencial usando un analizador de sangre automático ADVIA 120 con software de múnido (Bayer Diagnostics, Nueva York, NY). Como se observa en la Figura 5, la Fc-TMP mostró la mayor respuesta, con un máximo de recuento de plaquetas de $4,3 \times 10^{12}$ plaquetas por l el día 5, que es más de 3,4 veces el valor de referencia de $1,2 \times 10^{12}$ plaquetas por l. La TMP(m)-TTR-PEG 5K tenía una respuesta moderada con un máximo a $2,3 \times 10^{12}$ plaquetas por l, que es poco menos de dos veces el nivel del valor de referencia. La forma no pegilada de TMP(m)-TTR muestra muy poca respuesta a $1,5 \times 10^{12}$ plaquetas por l, que es solo un 20% superior al nivel del valor de referencia. La forma no pegilada de TMP(m)-TTR muestra mejor unión *in vitro* que sus contrapartidas pegiladas (Figura 4), pero tiene un mal rendimiento *in vivo* en comparación con TMP(m)-TTR-PEG 5K. Esto indica que el PEG es necesario para mejorar la semivida biológica del constructo de TTR, y esto compensa sobradamente la afinidad reducida por el receptor.

Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra que la mutación de la cisteína 10 en TTR a alanina, TTR(C10A), no tiene un impacto significativo sobre su estructura oligomérica. Se inyectaron aproximadamente 50 μg de cada una de TTR y TTR(C10A) en una columna Biosep-Sec-S 3000 (7,8 mm de DI x 300 mm) (Phenomenex) en tampón SEC a 1 ml/min. Se usaron patrones de peso molecular de Bio-Rad (151-1901) para calibrar la columna y calcular el tamaño molecular aproximado de las muestras inyectadas. Como puede observarse en la Figura 6, la TTR(C10A) eluye aproximadamente a 8,8 min, lo que corresponde a un tamaño molecular de 57 kDa, que es similar al peso molecular calculado del tetrámero de 55 kDa. Este dato, combinado con la observación de que ambas formas de TTR son resistentes a la precipitación a 65°C (datos no mostrados), indica que la mutación de cisteína 10 a alanina no tiene un impacto significativo sobre la estructura o estabilidad de la TTR.

Ejemplo 13

Este ejemplo demuestra que la mutación de la alanina 37 a cisteína, TMP-TTR(C10A/A37C), del aspartato 38 a cisteína, TMP-TTR(C10A/D38C), de la alanina 81 a cisteína, TMP-TTR(C10A/A81C), o de la glicina 83 a cisteína, TMP-TTR(C10A/G83C) con el fondo de cisteína 10 a alanina no tiene un impacto significativo sobre la estructura oligomérica de la TTR. Además, este ejemplo demuestra que la pegilación de estas formas mutantes de TTR con un PEG de 5K o 20K produce dos especies distintas de TTR con un tamaño molecular significativamente mayor que la forma no pegilada. Se llevó a cabo la pegilación de TTR reduciendo en primer lugar aproximadamente 8 ml de TTR (7,28 mg/ml) con DTT 10 mM durante 30 minutos a 30°C en presencia de Tris-HCl 50 mM, pH 8,5. Se desaló la TTR reducida usando una columna media SEPHADEX™ G25 de 26 ml (2,6 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech) a 2,5 ml/min en Tris-HCl 20 mM, pH 8,5. Se determinó entonces la concentración midiendo la absorbancia de la TTR reducida a 280 nm y usando el coeficiente de extinción calculado (29.450 M^{-1} para TMP-TTR(C10A/A37C) (5,14 mg/ml). Se mezcló inmediatamente la mitad (4,6 ml) de la muestra reducida con 810 μl de metoxi-PEG-maleimida 5K 5 mM (Shearwater Corporation, Huntsville, AL) y se mezcló la mitad restante con 1620 μl de metoxi-PEG-maleimida 20K 2,5 mM (Shearwater Corporation). Se dejó proseguir la reacción a 30°C durante 30 min y se inactivó mediante la adición de 46 μl de DTT 1 M. Se cargó entonces cada muestra pegilada en una columna HiTrap Q-sepharose de 5 ml a 2,5 ml/min y se lavó con varios volúmenes de columna de tampón Q A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) a 5 ml/min. Se eluyeron las columnas con un gradiente lineal de 40% de tampón Q B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) seguido de una etapa de 2 volúmenes de columna de 100% de tampón Q B. Se agruparon las fracciones de pico y se determinó la concentración midiendo la absorbancia del agrupamiento a 280 nm. Se inyectaron aproximadamente 50 μg de cada muestra en una columna Biosep-Sec-S 3000 (7,8 mm de DI X 300 mm) (Phenomenex) en tampón SEC a 1 ml/min. Se usaron patrones de peso molecular de Bio-Rad (151-1901) para calibrar la columna y calcular el tamaño molecular aproximado de las muestras inyectadas. Como puede observarse en la Figura 7, el tamaño

molecular aparente de los 4 constructos de TMP-TTR no pegilados está entre 40 y 45 kDa, que es notablemente menor que el tetrámero de 70 kDa esperado. Este tiempo de elución retardado es probablemente debido a una ligera interacción del constructo de TMP-TTR con la resina de exclusión por tamaño, que se ha observado con varios otros constructos de TMP (datos no mostrados). Después de conjugar con PEG 5K, el tamaño molecular aparente aumenta a entre aproximadamente 421 y 428 kDa (elución 1,53-1,64 minutos más avanzada que las contrapartidas no pegiladas), que es mucho mayor que los 90 kDa esperados. La observación de un peso molecular exagerado de las moléculas pegiladas en la cromatografía de exclusión por tamaño es un fenómeno observado frecuentemente (datos no mostrados). Los constructos de PEG 20K eluyen antes que el patrón de calibración mayor (670 kDa), mostrando una elución 1,28-1,40 minutos más avanzada que sus contrapartidas pegiladas con 5K. Estos datos tomados en agrupamiento demuestran que las 4 formas mutantes por ingeniería genética de TMP-TTR pueden pegilarse, aumentando drásticamente su tamaño molecular aparente.

Se analizaron aproximadamente 2 µg de los constructos de TMP-TTR por PAGE-SDS (Figura 8). Esta figura demuestra mediante desplazamiento en gel que la mayoría de monómeros de TMP-TTR estaban modificados por solo una metoxi-PEG-maleimida y que la reacción era casi completa, dejando muy poco monómero no modificado.

15 Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra que Fc-TMP, TMP-TTR(C10A/A37C), TMP-TTR(C10A/D38C), TMP-TTR(C10A/A81C) y TMP-TTR(C10A/G83C) tienen afinidades similares por receptor de MPL humano *in vitro*. Para este ejemplo, se unió Fc-TMP con un chip de proteína G de BIAcore a alta densidad según las instrucciones del fabricante (BIAcore, Uppsala, Suecia). Se preincubaron las proteínas de ensayo con receptor de MPL 5 nM en tampón de unión (PBS de Dulbecco (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) con seroalbúmina bovina 0,1 mg/ml y 0,005% de P20 (polioxietilensorbitán)) durante > 2 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Para las proteínas no pegiladas, se añadió heparina 0,1 mg/ml para evitar la unión no específica. Se pasaron entonces todas las muestras por el chip a 50 µl/min en tampón de unión. Se tomó el criterio de valoración de equilibrio 3 min después de la inyección. Como puede observarse en la Figura 9, todos los constructos de TTR mostraban una afinidad similar por el receptor de MPL, con afinidades en el intervalo de 0,881 a 2,333 nM, mientras que el constructo de Fc-TMP tenía afinidades en el intervalo de 3,276 a 5,369 nM.

Ejemplo 15

Este ejemplo muestra el efecto de inyectar constructos de TMP-TTR pegilados a ratones sobre el recuento de plaquetas sanguíneas. Para este ejemplo, se repartieron 170 ratones BDF1 en 17 grupos y se les inyectó (día 0) por vía subcutánea 50 µg de proteína de ensayo por kg de animal (constructo de fusión de TMP, Fc-TMP o un control de TTR(C10A)). Se dividió cada grupo en dos mitades y se extrajo sangre (140 µl) en puntos temporales alternados (días 0, 3, 5, 7, 11, 12 y 14). Se anestesiaron los ratones con isoflurano antes de la recogida.

Se analizó en la sangre recogida un recuento completo y diferencial usando un analizador de sangre automático ADVIA 120 con software de múrido (Bayer Diagnostics, Nueva York, NY). Como se observa en la Figura 10A, la Fc-TMP mostró la mayor respuesta, con una elevación del recuento de plaquetas de más de $4,2 \times 10^{12}$ plaquetas por l el día 5, que es 3 veces el valor de referencia de $1,4 \times 10^{12}$ plaquetas por l. Todos los 4 constructos de TMP-TTR no pegilados actuaron mejor que el control, pero no tan bien como Fc-TMP, con recuentos de plaquetas entre $1,8$ y $2,9 \times 10^{12}$ plaquetas por l el día 5, que es una mejora de entre 29 y 107% frente al valor de referencia. Como puede observarse en la Figura 10B, la adición de un grupo PEG de 5K a la cisteína introducida por ingeniería genética de los 4 constructos de TMP-TTR mejora sustancialmente la eficacia, con recuentos de plaquetas de entre $3,7$ y $4,4 \times 10^{12}$ plaquetas por l (de 2,8 a 3,4 veces el valor de referencia).

También como puede observarse en la Figura 10C, la conjugación de PEG de 20K con TMP-TTR da como resultado una mejora adicional, pero menos drástica, de la eficacia, con recuentos de plaquetas de entre $4,2$ y $4,6 \times 10^{12}$ plaquetas por l (de 3,2 a 3,5 veces el valor de referencia). Puesto que todos los constructos de fusión de TMP tenían afinidades de unión similares por MPL *in vitro*, esta diferencia es probablemente debida al efecto de la conjugación con PEG que aumenta la semivida biológica eficaz del constructo.

Ejemplo 16

Este ejemplo muestra el efecto de inyectar constructos de PTH-TTR pegilados a ratones sobre la liberación de calcio ionizado. Para este ejemplo, se repartieron 60 ratones BDF1 macho de 4 semanas en 12 grupos y se les inyectó por vía subcutánea (día 0) 8,91 mg de proteína de ensayo por kg de animal (constructo de fusión de PTH, PTH-Fc o un control de TTR(C10A)). Se extrajo sangre de cada grupo (75 µl) en los puntos temporales de 0, 24, 48 y 72 horas. Se anestesiaron los ratones antes de la recogida.

Se analizó en la sangre recogida el calcio ionizado usando un analizador de Ca^{++} /pH Ciba Corning 634. Como se observa en la Figura 11, PTH-Fc, PTH-TTR(C10A/K15A/A37C) (PEG 5K), PTH-TTR(C10A/K15A/A37C) (PEG 20K), PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 5K) y PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 20K) mostraron la mayor respuesta, con niveles de calcio ionizado que se elevan a entre 2,2 y 2,7 mmol por l a las 24 horas después de la inyección, lo que es 1,7 veces el valor de referencia de 1,3 mmol por l. A las 72 h después de la inyección, los niveles de calcio ionizado de todos los grupos volvieron al valor de referencia, excepto los grupos tratados con PTH-

TTR(C10A/K15A/A37C) (PEG 5K), PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 5K) y PTH-TTR(C10A/K15A/G83C) (PEG 20K), que mantuvieron niveles de calcio ionizado elevados de entre 1,8 y 1,9 mmol por l. Los constructos de PTH-TTR no pegilados eran equivalentes o ligeramente mejores que el control de TTR(C10A) en la elevación de los niveles de calcio ionizado en suero.

5 Ejemplo 17

Este ejemplo describe la construcción de un plásmido que contiene PTH-TTR(C10A/K15A/A81C). Se ligó el fragmento XbaI/XbaI de 5920 con el vector purificado derivado de digerir el plásmido 5643 (descrito en el ejemplo 1) con XbaI. Se describe la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido resultante como 5933 PTH-TTRC10A/K15A/A81C.

SEQ ID NO:43:

ATGTCCTGTTTCTGAAATCCAGCTGATGCATAACCTGGGTAAACATCTGAACTCTA
TGGAACGTGTTGAATGGCTGCGTAAAGAACTGCAGGACGTTTCATAACTTTGGTCC
AACTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTTCGAGTTCTAGATGCTGTC
CGAGGCAGTCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGCTGCTGATG

ACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCTGCATGG
GCTCACAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATAGACACC
AAATCTTACTGGAAGTGTCTTGGCATCTCCCCATTCATGAGCATGCAGAGGTGG
TATTCACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCTGCTGAG
CCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAATAA

10

Ejemplo 18

Este ejemplo describe la preparación de una fusión de GLP-1-TTR(C10A/G83C) y una fusión de GLP-1-TTR(C10A/K15A/G83C). Se clonaron estos constructos usando el plásmido pAMG21, que se describe en el Ejemplo 1. Cada uno de los oligonucleótidos utilizados en este ejemplo se enumera en la Tabla 6.

15 El hospedador bacteriano GM121 es una cepa K-12 de *E. coli* que se ha modificado para contener el represor lacI^o en la región *ebg* tardía (68 minutos). La presencia de este gen represor permite el uso de este hospedador con una variedad de sistemas de expresión, sin embargo este represor es irrelevante para la expresión de luxPR. El hospedador no transformado no tiene resistencias a antibióticos. Específicamente, se modificó F'tet/393 mediante el suministro de un constructo de lacI^o en el operón *ebg* entre las posiciones nucleotídicas 2493 y 2937 como se numeran en el número de acceso a Genbank M64441Gb_Ba, con la delección de la secuencia de *ebg* intermedia. Se suministró el constructo al cromosoma usando un fago recombinante llamado AGebg-lacI^o n^o5.

20 Después de la recombinación y resolución, solo el inserto cromosómico descrito anteriormente permanece en la célula. Se renombró F'tet/GM120. Se mutó entonces F'tet/GM120 en el gen *hsdR* para inactivarlo. Este se renombró F'tet/GM121. Se curó el episoma F'tet de la cepa, se verificó como sensible a tetraciclina y se almacenó como GM121 (ATCC n^o 202174).

25 Se realizó la PCR con el kit Roche PCR Core (n^o de cat. 1.578.553) en reacciones de 80 µl que contenían 2-4 µl de molde de ADN de plásmido minipreparativo, 1 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada oligonucleótido, 5% de DMSO (Sigma) y 2 U de ADN polimerasa Taq para amplificar la secuencia de GLP-1 y un ligador. Los ciclos de reacción fueron 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de [94°C durante 5 s, 45°C durante 30 s, 72°C durante 1 min]. Se purificaron los productos de PCR con el kit de purificación de PCR QIAquick® según el protocolo del fabricante (QIAGEN). Se digirieron los productos y vectores de PCR con NdeI y KpnI (New England Biolabs).

30 Se purificó el ADN digerido en un gel de agarosa, se mezcló entonces y se ligó con ADN ligasa T4 (New England Biolabs) durante 1,5-2 horas a temperatura ambiente. Se transformó cada mezcla de ligamiento mediante electroporación en la cepa hospedadora GM121 descrita anteriormente con un *E. coli* Pulser de Biorad a 2,5 KV en una cubeta con una longitud de hueco de 2 mm. Se dejaron recuperar las células en 2 ml de caldo Terrific (TB) durante aproximadamente 3 horas a 37°C a 250 rpm. Se sembraron 70-100 µl del cultivo de recuperación en agar LB que contenía kanamicina 40 µg/ml. Se prepararon minipreparaciones de ADN y se verificaron los clones correctos mediante secuenciación nucleotídica.

35 Para preparar la fusión GLP-1-TTR(C10A/G83C), se sintetizaron dos oligonucleótidos, el oligonucleótido 1209-85, que se une a la región del promotor luxR, y 3131-63, que codifica los 12 últimos aminoácidos del ligador de fusión y los 8 primeros aminoácidos de TTR. Se amplificó un plásmido pAMG21 derivado de una cepa que expresa una secuencia de GLP-1 con un inicio Met-Lys N-terminal seguido de una secuencia de 7 histidinas para purificación en columna de níquel, una secuencia de ácido aspártico-ácido glutámico-valina-ácido aspártico para escisión antes de

40

2973-78:

CCG CGG ATC CTC GAG ATT AGG ATC CAG AAC CCC CTT TGG CTT TGG AGA TGG T (SEQ ID NO:54).

Se fusionó entonces este fragmento con 5619 en una PCR posterior mediante los oligos 2973-78 y

2973-79:

5 GAG GAA TAA CAT ATG GGT CCA ACT GGT ACC GGT GAA TCC AAG (SEQ ID NO:55),

seguido de digestión con NdeI/XhoI y clonación en pAMG21 digerido de forma similar. El plásmido resultante se describe como 6017 (TTRC10A-CH2):

SEQ ID NO:56:

ATGGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTCAAAGTTCTAG
 ATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCCAGAAAGGC
 TGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAG
 CTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAA
 TAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGC
 AGAGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCC
 CTGCTGAGCCCCACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAG
 GTTCTGGCTCCGGATCAGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAA
 GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
 CAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
 AAGGGGTTCTGGATCCTAA

10

Se reemplazó el fragmento de XbaI/XbaI de 6017 por el correspondiente fragmento de 5704 como se describe anteriormente para construir TMP-TTRC10A-CH2 (cepa 6024):

SEQ ID NO:57:

ATGATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCTGGCGGTGGTG
 GCGGAGGGGGTGGCATTTGAGGGCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTTGCAGCACGCGC
 AGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTCAAAGTTCTAGAT
 GCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCCAGAAAGGCTG
 CTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCT
 GCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATA
 GACACCAAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGCAG
 AGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCT
 GCTGAGCCCCACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAGGT
 TCTGGCTCCGGATCAGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGG
 ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
 CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA
 GGGGGTTCTGGATCCTAA

15

Se realizó la construcción de TTRC10A-CH2-TMP como sigue: se amplificó el fragmento de TMP que contiene un ligador 5' BamHI y un ligador 3' XhoI mediante los oligos 2694-19 y

2974-70:

GAG GAA TAA GGA TCC ATC GAA GGT CCG ACT CTG CG (SEQ ID NO:58)

Se digirió el fragmento amplificado con BamHI y XhoI y se ligó posteriormente con 6017 restringido de forma similar. Se describe el clon resultante como cepa 6104 (TTRC10A-CH2-TMP).

20

SEQ ID NO:59:

ATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTCAAAGTTCTAG
 ATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGC
 TGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAG
 CTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAAGTGGAAA
 TAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCATGAGCATGC
 AGAGGTGGTATTCACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCC
 CTGCTGAGCCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCTGTCACCAATCCCAAGGAAG
 GTTCTGGCTCCGGATCAGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAA
 GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT
 CAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
 AAGGGGTTCTGGATCCATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCG
 TGCTGGCGGTGGTGGCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCAACCCTTCGCCAATGG
 CTTGCAGCACGCGCATAA

5 Se realizó otra configuración de esta fusión como TMP-CH2-TTR2. Se ligó en primer lugar el dominio CH2 derivado de TMP-Fc con el extremo N de TTRC10A mediante PCR de dos etapas. Se amplificó en primer lugar el dominio CH2 (que contiene de 5' a 3': un ligador NdeI-BamHI, CH2 y los 7 primeros codones de TTRC10A) mediante los oligos

2974-65:

TTC ACC GGT ACC AGT TGG ACC AGA ACC CCC TTT GGC TTT GGA GAT GGT (SEQ ID NO:60), y

10 2974-66:

GAG GAA TAA CAT ATG GGA TCC GGT TCT GGG GGA CCG TCA GTT TTC CTC (SEQ ID NO:61).

Se fusionó este fragmento con 5619 en una PCR posterior mediante los oligos 2974-66 y 2693-80 (Ejemplo 1), seguido de restricción con NdeI/XhoI y clonación en pAMG21 restringido de forma similar. El clon resultante se describe como 6016 (CH2-TTRC10A):

15 SEQ ID NO: 62

ATGGGATCCGGTTCTGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGG
 ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
 CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
 GGGGTTCTGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTCAAAG
 TTCTAGATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAG
 AAAGGCTGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCT
 GGAGAGCTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAG
 TGGAAATAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCATGA
 GCATGCAGAGGTGGTATTCACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATT
 GCCGCCCTGCTGAGCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCTGTCACCAATCCCA
 AGGAATAA

Se amplificó el fragmento de TMP que contiene un ligador NdeI en el extremo 5' y un ligador BamHI en el extremo 3' mediante los oligos

20 2974-68:

GAG GAA TAA CAT ATG ATC GAA GGT CCG ACT CTG (SEQ ID NO:63), y

2974-69:

TAA CAT ATG GGA TCC TGC GCG TGC TGC AAG CCA TTG (SEQ NO:64).

Se digirió entonces este fragmento con NdeI/BamHI y se ligó con el vector que se había restringido de forma similar y purificado en gel de la cepa 6106. El clon resultante se describe como 6110 (TMP-CH2-TTRC10A):

SEQ ID NO: 65:

ATGATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCTGGCGGTGGTG
GCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCAACCCTTCGCCAATGGCTTGCAGCACGCGC
AGGATCCGGTTCTGGGGGACCGTCAGTTTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGG
TCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG
GGTTCTGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTCAAAGTT
CTAGATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTCAAG
AGGCTGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAAGTGAAGTGG
AGAGCTGCATGGGCTCACAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTG
GAAATAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCATTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGC
ATGCAGAGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGC
CGCCCTGCTGAGCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAG
GAATAA

5 Ejemplo 21

Este ejemplo describe la construcción de TTRC10A/K15A-TMP, TTRC10A/K15A/A81C-TMP y TTRC10A/K15A/G83C-TMP.

10 Se clonó también TMP en los extremos C de TTR y variantes de la misma. Se amplificó la TMP completo que contenía en su extremo N-terminal un ligador de 5 aminoácidos (gsgsg) más los 7 últimos aminoácidos de TTR wt mediante el siguiente agrupamiento de oligonucleótidos en un procedimiento de PCR estándar.

2694-18:

GTC GTC ACC AAT CCC AAG GAA GGT TCT GGT TCT GGT ATC GAA (SEQ ID NO:66), y

2694-19:

CCG CGG ATC CTC GAG ATT ATG CGC GTG CTG CAA GCC ATT G (SEQ ID NO:67).

15 Se ligó adicionalmente este fragmento de PCR con el extremo 3' de TTR wt mediante una segunda PCR que utiliza los oligos 2694-19 y 2693-79 como se describe en el Ejemplo 1. Se confirmó la secuencia del clon resultante y se describe como cepa 5365 (TTR-TMP):

SEQ ID NO: 68:

ATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGTGTCTCTGATGGTCAAAGTTCTAG
ATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTCAAGAGGC
TGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAAGTGAAGTGGAGAG
CTGCATGGGCTCACAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAA
TAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGC
AGAGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCC
CTGCTGAGCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAG
GTTCTGGTTCTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGC
TGGCGGTGGTGGCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCAACCCTTCGCCAATGGCTT
GCAGCACGCGCATAA

20 Se reemplazó entonces el fragmento XbaI/XbaI de 5365 por el correspondiente fragmento XbaI/XbaI de la cepa 5895, preparando la cepa 5921 (TTRC10A/K15A-TMP) como se describe anteriormente:

SEQ ID NO: 69:

ATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTTCGCAGTTCTAG
ATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTCAAGAGGC
TGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAAGTGAAGTGGAGAG
CTGCATGGGCTCACAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAA
TAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGC

AGAGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCC
 CTGCTGAGCCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAG
 GTTCTGGTTCTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGC
 TGGCGGTGGTGGCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTT
 GCAGCACGCGCATAA

5 Se modificó posteriormente el plásmido 5921 reemplazando los aminoácidos en las siguientes posiciones: A37, A81 y G83, por el aminoácido cisteína como se describe en el Ejemplo 1, excepto porque se reemplazó el oligo 3' TTR utilizado con los oligos de mutación (2693-80) en el Ejemplo 1 por 2694-19, dando como resultado la cepa 5982 que contiene TTRC10A/K15A/A37C-TMP (SEQ ID NO:70), la cepa 5983 que contiene TTRC10A/K15A/A81C-TMP (SEQ ID NO:71) y la cepa 5984 que contiene TTRC10A/K15A/G83C-TMP (SEQ ID NO:72).

SEQ ID NO:70:

ATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTTCGAGTTCTAG
 ATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGC
 TTGTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAG
 CTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAA
 TAGACACCAAATCCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGC
 AGAGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCC
 CTGCTGAGCCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAG
 GTTCTGGTTCTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGC
 TGGCGGTGGTGGCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTT
 GCAGCACGCGCATAA

SEQ ID NO:71:

10 ATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTTCGAGTTCTAG
 ATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGC
 TGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAG
 CTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAA
 TAGACACCAAATCCTTACTGGAAGTGTCTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGC
 AGAGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCC
 CTGCTGAGCCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAG
 GTTCTGGTTCTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGC
 TGGCGGTGGTGGCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTT
 GCAGCACGCGCATAA

SEQ ID NO:72:

ATGGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGCTCCTCTGATGGTTCGAGTTCTAG
 ATGCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGC
 TGCTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAG
 CTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAA
 TAGACACCAAATCCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGC
 AGAGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCC
 CTGCTGAGCCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAG
 GTTCTGGTTCTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGC
 TGGCGGTGGTGGCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCCAACCCCTTCGCCAGTGGCTT
 GCAGCACGCGCATAA

Ejemplo 22

15 Este ejemplo describe la construcción de TMP-TTRC10A/K15A/A81C y TMP-TTRC10A/K15A/A37C. Se mutagenizó la Lys en posición 15 de TTR por Ala en las cepas 5704, 5706 y 5707 mediante los siguientes métodos. Se digirió el plásmido 5513 con NdeI/KpnI, se purificó el inserto que alberga el fragmento de TMP y los 6 primeros aminoácidos de TTR y se ligó con el vector restringido con NdeI/KpnI y purificado en gel derivado de la cepa 5895. Se describe la cepa bacteriana que contiene el plásmido resultante como 5919 (TMP-TTRC10A/K15A/G83C). Se digirió entonces el
 20 plásmido 5919 con XbaI, se purificó en gel el fragmento XbaI/XbaI resultante que contiene TMP y los 18 primeros codones de TTR, incluyendo las mutaciones C10A y K15A, y se ligó con vectores digeridos con XbaI, tratados con fosfatasa y purificados en gel derivados de las cepas 5704 y 5706. Las nuevas cepas se describen como 5918 (TMP-TTRC10A/K15A/A81C) y 6023 (TMP-TTRC10A/K15A/A37C).

TMP-TTRC10A/K15A/G83C (SEQ ID NO:73):

ATGATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCTGGCGGTGGTG
 GCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTTGCAGCACGCGC
 AGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGC'TCCTCTGATGGTTCGCAGTTCTAGAT
 GCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGCTG
 CTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCT
 GCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATA
 GACACCAAATCTTACTGGAAGGCAC'TTGCATCTCCCCAT'TCCATGAGCATGCAG
 AGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCT
 GCTGAGCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCTGTCACCAATCCCAAGGAATAA

TMP-TTRC10A/K15A/A81C (SEQ ID NO:74):

ATGATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCTGGCGGTGGTG
 GCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTTGCAGCACGCGC
 AGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGC'TCCTCTGATGGTTCGCAGTTCTAGAT
 GCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGCTG
 CTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCT
 GCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATA
 GACACCAAATCTTACTGGAAGTGTCTTGGCATCTCCCCAT'TCCATGAGCATGCAG
 AGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCT
 5 GCTGAGCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCTGTCACCAATCCCAAGGAATAA

TMP-TTRC10A/K15A/A37C (SEQ ID NO:75):

ATGATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCTGGCGGTGGTG
 GCGGAGGGGGTGGCATTGAGGGCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTTGCAGCACGCGC
 AGGTCCAACCTGGTACCGGTGAATCCAAGGC'TCCTCTGATGGTTCGCAGTTCTAGAT
 GCTGTCCGAGGCAGTCCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGCTT
 GTGATGACACCTGGGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCT
 GCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATA
 GACACCAAATCTTACTGGAAGGCAC'TTGGCATCTCCCCAT'TCCATGAGCATGCAG
 AGGTGGTATTACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCT
 GCTGAGCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCTGTCACCAATCCCAAGGAATAA

Ejemplo 23

10 Este ejemplo describe la expresión de proteínas de fusión de GLP-1 en *E. coli*. Se usaron 25-100 ml de un cultivo de una noche saturado para inocular 50 ml de TB con kanamicina 20 µg/ml en un matraz con deflectores de 250 ml y se incubó a 37°C y 250 rpm durante una noche. Se usaron 10-35 ml de estos cultivos de una noche para inocular 1 l de TB con kanamicina 20 µg/ml en un matraz con deflectores de 2 l y se incubó a 37°C y 250 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó aproximadamente 0,7. Se indujeron entonces los cultivos a expresar proteína recombinante mediante la adición de: 1 ml de etanol que contenía N-(B-cetocaproil)-DL-homoserinalactona (Sigma) 30 µg/ml en el caso de pAMG21, o IPTG 0,1 mM en el caso de pAMG33*. Se continuó la incubación durante 2-4 horas adicionales y se recogieron las células mediante centrifugación.

Ejemplo 24

20 Este ejemplo describe la purificación de PTH-TTR(C10A/K15A/A81C). Se descongelaron aproximadamente 197 g de pasta de *E. coli* del clon 5933 almacenada a -80°C en 1480 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0. Se disolvieron 60 comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa Sigma 1-873-580 (Saint Louis, MO) en la suspensión celular y se pasó la suspensión a través de un microfluidificador de modelo 110-Y (Microfluidics, Newton, MA) dos veces a 96,5 MPa. Se centrifugó el lisado a 11.325 x g durante 50 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante como fracción soluble. Se calentó la fracción soluble en baño de agua a 65°C durante 30 minutos en frascos de polipropileno, en cuyo momento la temperatura de los contenidos era de 63°C. Se centrifugó la fracción soluble a 25 11.325 x g durante 50 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante como termosoluble. Se filtró la fracción termosoluble a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm con dos prefiltros y se cargó entonces en una columna Q-sepharose fast flow de 240 ml (5 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 25 ml/min equilibrada en tampón Q A (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Se lavó la columna con aproximadamente 2200 ml de tampón Q A a 30 ml/min. Se eluyó la columna Q con 15 volúmenes de 30 columna de gradiente lineal de 60% de tampón Q B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,0) seguido de una etapa de 2 volúmenes de columna de 100% de tampón Q B. Se agruparon las fracciones que contienen la fusión de TTR determinadas por PAGE-SDS en un solo agrupamiento Q (1300 ml). Se añadieron lentamente al agrupamiento Q 464 ml de sulfato de amonio 3,8 M a pH 7,2. Se centrifugó la disolución a 11.325 x g durante 50 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante como fracción soluble con sulfato de amonio, se desechó y se resuspendió el 35 sedimento en 450 ml de NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,0, mediante agitación suave a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. Se retiró el sobrenadante como fracción soluble con tampón fosfato y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm. Se añadieron 240 µl de ditiotreitól 1 M a la fracción soluble con tampón

fosfato y se cargó en una columna de hidroxapatito cerámico de tipo 1 de 105 ml (2,6 cm) (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) a 10 ml/min en tampón HA A. Se lavó la columna con aproximadamente 210 ml de tampón HA A a 10 ml/min, seguido de 3 etapas de 25%, 50% y 100% de tampón HA B (NaH₂PO₄ 400 mM, pH 7,0). Se agruparon las fracciones de la elución al 50% como agrupamiento HA (725 ml) y se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm. Se añadieron 1,16 g de ditiotreitól al agrupamiento HA y se elevó el pH a 8,0 usando base Tris seguido de incubación a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se diluyó el agrupamiento HA con 750 ml de agua y se cargó en una columna Source 15Q de 50 ml (2,6 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech) a 10 ml/min seguido de lavado con aproximadamente 250 ml de tampón Q A. Se eluyó la columna con 20 volúmenes de columna de gradiente lineal de 10 a 60% de tampón Q B seguido de una etapa de 2 volúmenes de columna de 100% de tampón Q B. Se agruparon las fracciones que contenían la fusión de TTR determinadas por PAGE-SDS en un solo agrupamiento Q2 (170 ml) y se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm. Se determinó que la concentración de proteína era de 3,7 mg/ml usando un coeficiente de extinción calculado de 23.950 M⁻¹cm⁻¹. Se determinó que el nivel de pirógenos era <1 UE/mg de proteína usando el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Se determinó que el contenido de ácidos nucleicos era despreciable, puesto que se determinó que la relación de absorbancia a 260 nm frente a 280 nm era de 0,61.

Ejemplo 25

Este ejemplo describe la purificación de TMP-TTR(C10A/D38C). Se descongelaron aproximadamente 170 g de pasta de *E. coli* del clon 5705 almacenada a -80°C en 1275 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0. Se disolvieron 50 comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa Sigma 1-873-580 (Saint Louis, MO) en la suspensión celular y se pasó la suspensión a través de un microfluidificador de modelo 110-Y (Microfluidics, Newton, MA) dos veces a 96 ,5 MPa. Se centrifugó el lisado a 11.325 x g durante 30 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante como fracción soluble y se desechó. Se resuspendieron los sedimentos en 1200 ml de agua usando un triturador de tejidos y se añadieron 20 comprimidos más de inhibidor de proteasa Sigma. Se centrifugó la suspensión a 11.325 x g durante 30 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro Whatman GF/A y se añadieron 2,1 y de ditiotreitól seguido de incubación a 7°C durante 30 minutos. Se cargó la muestra reducida en una columna Q-sepharose fast flow de 240 ml (5 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 30 ml/min equilibrada con tampón Q A (Tris-HCl 20 mM, 0,02% de azida de sodio, pH 8,0) a 7°C. Se lavó la columna con aproximadamente 1920 ml de tampón Q A a 30 ml/min. Se eluyó la columna Q con 3 etapas de 20%, 35% y 100% de tampón Q B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, 0,02% de azida de sodio pH 8,0). Se añadieron 13 ml de EDTA 500 mM a pH 8,0 al flujo de la columna Q y se centrifugó durante 30 min a 11.325 g a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 700 ml de urea 4 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Se filtró entonces el sedimento solubilizado con urea a través de un filtro Whatman GF/A y se cargó en una columna Q-sepharose fast flow de 240 ml (5 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 30 ml/min equilibrada con tampón Q A (Tris-HCl 20 mM, 0,02% de azida de sodio, pH 8,0) a 7°C. Se lavó la columna con aproximadamente 1920 ml de tampón Q A a 30 ml/min. Se eluyó la columna Q con 3 etapas de 20%, 35% y 100% de tampón Q B (Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, 0,02% de azida de sodio, pH 8,0) a 15 ml/min. Se agruparon las fracciones que contenían el pico de elución al 35%, se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm y se añadieron 0,5 g de ditiotreitól (concentración final 10 mM) seguido de incubación durante 30 min a 7°C. Se cargó entonces el agrupamiento Q al 35% en una columna de hidroxapatito cerámico de tipo 1 de 45 ml (2,6 cm) (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) a 5 ml/min en Tris-HCl 20 mM, NaCl 350 mM, pH 8,0 a 7°C. Se lavó la columna con aproximadamente 70 ml de Tris-HCl 20 mM, NaCl 350 mM, pH 8,0 a 5 ml/min seguido de 3 etapas de 2,5%, 25% y 100% de tampón HA B (NaH₂PO₄ 400 mM, pH 7,0). Se agruparon las fracciones de elución al 2,5% como agrupamiento HA (80 ml) y se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm. Se determinó que la concentración de proteína era de 6,8 mg/ml usando un coeficiente de extinción calculado de 29.450 M⁻¹cm⁻¹. Se determinó que el nivel de pirógenos era <1 UE/mg de proteína usando el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Se determinó que el contenido de ácidos nucleicos era despreciable, puesto que la relación de absorbancia a 260 nm frente a 280 nm era de 0,54.

Ejemplo 26

Este ejemplo describe el replegamiento y purificación de TTR(C10A)-CH2-TMP. Se descongelaron aproximadamente 23 g de pasta de *E. coli* del clon 6104 almacenada a -80°C en 200 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0. Se disolvieron 10 comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa Sigma 1-873-580 (Saint Louis, MO) en la suspensión celular y se pasó la suspensión a través de un microfluidificador (Microfluidics, Newton, MA) dos veces a 82,74 MPa. Se centrifugó el lisado a 15.344 x g durante 50 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante como fracción soluble y se desechó. Se resuspendió el sedimento en 200 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0 usando triturador de tejidos. Se centrifugó la suspensión a 15.344 x g durante 50 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante como lavado y se desechó. Se resuspendió el sedimento en 50 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0 usando un triturador de tejidos. Se centrifugó la suspensión a 14.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante como lavado y se desechó. Se disolvieron los sedimentos en 50 ml de guanidina-HCl 8 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 usando un sonicador durante aproximadamente 1 min. Se redujo la proteína disuelta durante 30 min a temperatura ambiente añadiendo 500 µl de DTT 1 M. Se centrifugó la proteína reducida durante 30 min a 20°C a 27.216 g. Se añadió entonces sobrenadante a 4 l de base de Tris 50 mM, base de arginina 160 mM, urea 1 M, cistamina 1 mM, cisteína 4 mM, pH 9,5 a 2 ml/min y se incubó aproximadamente 16 horas a 4°C. Se filtró entonces la proteína replegada a través de un Gellman SUPORCAP® 50 y se concentró entonces a aproximadamente 500 ml

usando un sistema de flujo tangencial de membrana YM10 Pall Filtron de 0,28 m² seguido de diafiltración frente a 2 l de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Se cargó entonces la proteína concentrada en una columna Source 15Q de 45 ml (2,6 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech) a 18 ml/min seguido de lavado con aproximadamente 150 ml de tampón Q A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Se eluyó la columna con 20 volúmenes de columna de gradiente lineal de 0 a 60% de tampón Q B seguido de una etapa de 2 volúmenes de columna de 100% de tampón Q B. Se agruparon las fracciones que contenían la fusión de TTR determinadas por PAGE-SDS en un solo agrupamiento Q (29 ml). Se concentró el agrupamiento Q a aproximadamente 6,3 ml usando un Millipore CENTRIPREP™ 10 y se pasó entonces a través de un filtro de membrana Pall ACRODISC® MUSTANG™ E a 1 ml/min. Se determinó que la concentración de proteína era de 10,5 mg/ml usando un coeficiente de extinción calculado de 46.410 M⁻¹cm⁻¹. Se determinó que el nivel de pirógenos era <1 UE/mg de proteína usando el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Se determinó que el contenido de ácidos nucleicos era despreciable, puesto que se determinó que la relación de absorbancia a 260 nm frente a 280 nm era de 0,51.

Ejemplo 27

Este ejemplo describe la purificación de GLP1-TTR (C10A/K15A/G83C). Se descongelaron aproximadamente 30 g de pasta de *E. coli* del clon 6450 almacenada a -80°C en 250 ml de NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0. Se pasó la suspensión celular a través de un microfluidificador (Microfluidics, Newton, MA) dos veces a 82,74 MPa. Se centrifugó el lisado a 15.344 x g durante 50 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante como fracción soluble y se resuspendió el sedimento en 200 ml de desoxicolato usando un triturador de tejidos. Se centrifugó la suspensión a 15.344 x g durante 50 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante como lavado y se resuspendió el sedimento en 200 ml de agua usando un triturador de tejidos. Se centrifugó la suspensión a 15.344 x g durante 50 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante como lavado y se resuspendió el sedimento en 100 ml de agua usando un triturador de tejidos. Se centrifugó la suspensión a 27.216 x g durante 30 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante como lavado y se disolvieron aproximadamente 2/3 de los sedimentos en 75 ml de guanidina-HCl 8 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 mediante agitación durante aproximadamente 15 min. Se centrifugó la suspensión a 27.216 x g durante 30 min a temperatura ambiente y se diluyó el sobrenadante con 18 ml de agua. Se cargó entonces la muestra en una columna Sepharose fast flow quelante de 40 ml (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), cargada con NiCl₂, a 5 ml/min. Después de lavar con aproximadamente 150 ml de tampón de Ni A (guanidina-HCl 6 M, 37,5 ml de Tris-HCl, pH 8,0) a 10 ml/min, se eluyó con dos etapas de 10% y 100% de tampón Ni B (guanidina-HCl 6 M, Tris-HCl 37,5 mM, imidazol 400 mM, pH 8,0). Se combinaron los picos que contenían el constructo de fusión como agrupamiento Ni (40 ml) y se determinó que el contenido de proteína era de 6,4 mg/ml observando la absorbancia a 280 nm en guanidina-HCl 8 M usando un coeficiente de extinción de 25.440 M⁻¹. Se añadieron 800 µl de EDTA 500 mM, pH 8,0 y se retiraron 80 mg de proteína de la reacción de pegilación. Se añadieron 230 µl de DTT 1 M y se incubó durante 30 min a 30°C. Se cargó en una columna media de SEPHADEX™ G25 de 130 ml (2,6 cm de DI) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 8 ml/min en Tris-HCl 20 mM, urea 6 M, pH 8,5. Se agruparon los picos de proteína determinados por absorbancia a 280 nm (22 ml) y se determinó que la concentración era de 3,2 mg/ml observando la absorbancia a 280 nm en Tris-HCl 20 mM, urea 6 M, pH 8,5 usando un coeficiente de extracción de 25.440 M⁻¹. Se hizo reaccionar un 45% del material intercambiado por tampón con 950 µl de metoxi-PEG-maleimida 5K 5 mM (Shearwater 25 Corporation, Huntsville, AL) durante 140 min a 30°C. Se añadieron 100 µl de 2-mercaptoetanol 1 M a cada reacción para inactivar. Se dializó la reacción frente a 1 l de NaH₂PO₄ 25 mM, urea 3 M, pH 7,25 usando un Slidealyzer Pierce de 10 kDa durante 2 horas a temperatura ambiente. Se cambió el tampón de diálisis por NaH₂PO₄ 25 mM, 10% de sacarosa, EDTA 2 mM, pH 7,25 y se incubó durante aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 140 µl de CHAPS al 5% y 7,28 µl de 2-mercaptoetanol y 0,475 ml de caspasa 3 mg/ml, seguid o de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Se cargó la mezcla de reacción en una columna HiTrap Q-sepharose HP de 5 ml (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 1 ml/min en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, seguido de un lavado de aproximadamente 15 ml con el mismo tampón. Se desarrolló entonces la columna a 5 ml/min usando un gradiente lineal de 60% de Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0 seguido de una etapa de 100% de tampón de elución. Se agruparon las fracciones que contenían la fusión de TTR determinadas por PAGE-SDS en un solo agrupamiento Q (9,5 ml). Se concentró el agrupamiento Q a 3,2 ml usando un Millipore CENTRIPREP™ de 30 kDa y se filtró a través de una membrana Pall MUSTANG™ E aproximadamente a 1 ml/min. Se diluyó el agrupamiento Q a 6,5 ml con agua y se añadieron 375 µl de acetonitrilo. Se inyectó en una columna Vydac C₄ de proteína/péptido de 10 X 250 mm (Vydac, Hisperia, CA) en 95% de tampón RP A (0,1% de ácido trifluoroacético) con 5% de tampón RP B (95% de acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético) a 5 ml/min. Se desarrolló la columna pasando un gradiente lineal de 100% de tampón RP B. Se concentró el pico de proteína a aproximadamente 3 ml usando un Millipore CENTRIPREP™ de 30 kDa y se diluyó a 15 ml usando Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Se repitió el intercambio de tampón 3 veces más y se pasó entonces a través de una membrana Pall MUSTANG™ E a aproximadamente 1 ml/min. Se determinó que la concentración de proteína era de 7,7 mg/ml usando un coeficiente de extinción calculado de 25.440 M⁻¹cm⁻¹. Se determinó que el nivel de pirógenos era < 1 UE/mg de proteína usando el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Se determinó que el contenido de ácido nucleico era despreciable, puesto que se determinó que la relación de absorbancia a 260 nm frente a 280 nm era de 0,54.

Ejemplo 28

Este ejemplo muestra el efecto de inyectar constructos de GLP1-TTR pegilados en ratones sobre los niveles sanguíneos de glucosa. Para este ejemplo, se repartieron 40 ratones db/db macho de 9 semanas de edad en 4

5 grupos y se les inyectó (hora 0) por vía intraperitoneal 7,4-16,6 mg de proteína de ensayo por animal (538 pmol de monómeros para todos los grupos) (10 mg de constructo de fusión GLP1-TTR pegilado de 5K, 10 mg de constructo de fusión GLP1-TTR pegilado de 5K, 16,6 mg de GLP1-Fc y 7,4 mg de un control TTR(C10A)). Se extrajo sangre de cada grupo en los puntos temporales 0 (medida del valor de referencia), 1, 4, 6, 12, 24 y 48 horas después de la inyección. Se mantuvo la alimentación de los ratones durante las 6 primeras horas del experimento y se reemplazó después de extraer sangre en el punto temporal de 6 horas.

Se analizó en cada gota de sangre recogida por punto temporal el contenido de glucosa usando un glucosímetro One Touch Profile y los resultados se exhiben en la Figura 12.

Ejemplo 29

10 Este ejemplo muestra el efecto de inyectar constructos de TMP-TTR con dominios CH2 de anticuerpo fusionados en ratones sobre el recuento sanguíneo de plaquetas. Para este ejemplo, se repartieron 50 ratones BDF1 hembra en 5 grupos y se les inyectó (día 0) por vía subcutánea 50 mg de proteína de ensayo por kg de animal (constructo de fusión de TMP, Fc-TMP o control de TTR(C10A)). Se dividió en dos mitades cada grupo y se extrajo sangre (140 ml) en puntos temporales alternados (día 0, 3, 5, 7 y 10). Se anestesiaron los ratones con isoflurano antes de la recogida.

15 Se analizó la sangre recogida para un recuento completo y diferencial usando un analizador automático de sangre ADVIA 120 con software de múnido (Bayer Diagnostics, Nueva York, NY). Como se observa en la Figura 13, la Fc-TMP mostró la mayor respuesta, elevándose el recuento de plaquetas a más de $4,2 \times 10^{12}$ plaquetas por l el día 5, que es 3 veces el valor de referencia de $1,4 \times 10^{12}$ plaquetas por l. Los tres constructos de TMP-TTR fusionados con CH2 actuaron mejor que el control, pero no tan bien como Fc-TMP, con recuentos de plaquetas de entre $2,3 \times 10^{12}$ y $2,6 \times 10^{12}$ plaquetas por l el día 5, que es entre un 64 y un 86% de mejora frente al valor de referencia.

Ejemplo 30

25 Este ejemplo muestra el efecto de inyectar constructos de TTR pegilados con TMP fusionado con el extremo carboxilo de TTR pegilada en ratones sobre el recuento sanguíneo de plaquetas. Para este ejemplo, se repartieron 80 ratones BDF1 en 8 grupos y se les inyectó (día 0) por vía subcutánea 50 mg de proteína de ensayo por kg de animal (constructos de fusión de TMP, Fc-TMP o un control de TTR(C10A)). Se dividió cada grupo en dos mitades y se extrajo sangre (140 ml) en puntos temporales alternados (días 0, 3, 5, 7, 10 y 12). Se anestesiaron los ratones con isoflurano antes de la recogida.

30 Se analizó en la sangre recogida un recuento completo y diferencial usando un analizador automático de sangre ADVIA 120 con software de múnido (Bayer Diagnostics, Nueva York, NY). Como se observa en la Figura 14, la Fc-TMP y las tres fusiones (TMP-TTR) aminoterminal mostraron la mayor respuesta, elevándose el recuento de plaquetas a entre $4,3 \times 10^{12}$ y $4,6 \times 10^{12}$ plaquetas por l el día 5, que es más de 3 veces el valor de referencia de $1,3 \times 10^{12}$ plaquetas por l. Los tres constructos (TTR-TMP) carboxiternales actuaron mejor que el control.

Ejemplo 31

35 Este ejemplo muestra el efecto de inyectar constructos de TTR-TMP pegilados que contienen una alteración K15A en ratones sobre el recuento sanguíneo de plaquetas. Para este ejemplo, se repartieron 120 ratones BDF1 en 12 grupos y se les inyectó (día 0) por vía subcutánea 50 mg de proteína de ensayo por kg de animal (constructos de fusión de TTR, Fc-TMP o un control de TTR(C10A)) (este estudio se repartió en dos lotes (muestras de PEG 20K en uno y PEG 5K y no pegiladas en el otro) completados en momentos separados con controles repetidos). Se dividió cada grupo en dos mitades y se extrajo sangre (140 ml) en puntos temporales alternados (días 0, 3, 5, 7, 10 y 12). Los ratones se anestesiaron con isoflurano antes de la recogida.

40 Se analizó en la sangre recogida un recuento completo y diferencial usando un analizador automatizado de sangre ADVIA 120 con software de múnido (Bayer Diagnostics, Nueva York, NY). Como se observa en la Figura 15A, los dos constructos no pegilados superaban el valor de referencia ($1,3 \times 10^{12}$ plaquetas por l), elevándose las respuestas de plaquetas el día 5 a entre $1,8 \times 10^{12}$ y $2,0 \times 10^{12}$ plaquetas por l. Como se observa en la Figura 15B, la Fc-TMP y las tres fusiones pegiladas con 5K mostraban respuestas equivalentes el día 5, elevándose los recuentos de plaquetas a entre $3,5 \times 10^{12}$ y $4,4 \times 10^{12}$ plaquetas por l, que es al menos 2,7 veces el valor de referencia ($1,3 \times 10^{12}$ plaquetas por l). Como se observa en la Figura 15C, Fc-TMP y las tres fusiones pegiladas de 20 K mostraban respuestas equivalentes el día 5, elevándose el recuento de plaquetas a entre $4,3 \times 10^{12}$ y $4,6 \times 10^{12}$ plaquetas por l, que es más de tres veces el valor de referencia de $1,3 \times 10^{12}$ plaquetas por l.

45 Además, los constructos de TTR pegilados de 20K parecen tener una respuesta prolongada mejorada, estando las plaquetas del día 7 en el intervalo de $3,7 \times 10^{12}$ a $4,9 \times 10^{12}$ plaquetas por l, en comparación con Fc-TMP a $3,1 \times 10^{12}$ plaquetas por l. Esta respuesta prolongada se mantiene el día 10 para los tres constructos de TTR pegilados de 20K, estando las plaquetas en el intervalo de $2,3 \times 10^{12}$ a $3,1 \times 10^{12}$ plaquetas por l, en comparación con Fc-TMP a $2,0 \times 10^{12}$ plaquetas por l.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Amgen Inc.
- <120> Uso de fusiones de proteína/péptido de transtiretina para aumentar...
- <130> A-813A (PCT)
- 5 <140> TBA
- <141> 04-03-2003
- <150> A-813
- <151> 04-04-2002
- <160> 75
- 10 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 127
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu Met Val Lys Val
 1 5 10 15

Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val Ala Val His Val
 20 25 30

Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys
 35 40 45

Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Glu Phe
 50 55 60

Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr
 85 90 95

Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala Leu Leu Ser
 100 105 110

Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
 115 120 125

- <210> 2
- <211> 387
- <212> ADN
- 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

agtgtccaa ctggtaccgg tgaatccaag tgtcctctga tgggtcaaagt tctagatgct 60

gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120

acctgggagc catttgctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180

actgaggagg aattttaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240

aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300

tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccag 360

gctgtcgtca ccaatcccaa ggaataa 387

ES 2 400 341 T3

<210> 3
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 3

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggtaaagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtcctgcat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
 acctgggagc catttgcctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta tccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatcccaa ggaataa 387

<210> 4
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 4

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggtaaagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtcctgcat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc ttgtgatgac 120
 acctgggagc catttgcctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta tccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatcccaa ggaataa 387

<210> 5
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 5

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggtaaagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtcctgcat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgcttgtgac 120
 acctgggagc catttgcctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta tccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatcccaa ggaataa 387

<210> 6
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 6

ES 2 400 341 T3

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggtaaagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
 acctgggagc catttgccctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aattttaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aagtgtcttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatcccaa ggaataa 387

<210> 7
 <211> 387
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggtaaagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
 acctgggagc catttgccctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aattttaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aaggcacttt gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatcccaa ggaataa 387

<210> 8
 <211> 387
 10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggtcgcagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
 acctgggagc catttgccctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aattttaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aaggcacttt gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatcccaa ggaataa 387

<210> 9
 15 <211> 495
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 400 341 T3

atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggaggcgga 60
 ggggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
 ggtaccggtg aatccaagtg tcctctgatg gtcaaagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
 cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctg ctgatgacac ctgggagcca 240
 tttgcctctg ggaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
 tttgtagaag ggatatacaa agtggaaata gacaccaaata cttactggaa ggcacttggc 360
 atctccccat tccatgagca tgcagaggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
 cgctacacca ttgccgcctt gctgagcccc tactcctatt ccaccacggc tgcctcacc 480
 aatccaagg aataa 495

<210> 10
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10
 atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggaggcgga 60
 ggggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
 ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcaaagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
 cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctt gtgatgacac ctgggagcca 240
 tttgcctctg ggaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
 tttgtagaag ggatatacaa agtggaaata gacaccaaata cttactggaa ggcacttggc 360
 atctccccat tccatgagca tgcagaggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
 cgctacacca ttgccgcctt gctgagcccc tactcctatt ccaccacggc tgcctcacc 480
 aatccaagg aataa 495

<210> 11
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 11
 atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggaggcgga 60
 ggggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
 ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcaaagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
 cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctg cttgtgacac ctgggagcca 240
 tttgcctctg ggaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
 tttgtagaag ggatatacaa agtggaaata gacaccaaata cttactggaa ggcacttggc 360
 atctccccat tccatgagca tgcagaggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
 cgctacacca ttgccgcctt gctgagcccc tactcctatt ccaccacggc tgcctcacc 480
 aatccaagg aataa 495

<210> 12
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 12

ES 2 400 341 T3

atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggggtggga 60
 ggggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
 ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcaaagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
 cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctg ctgatgacac ctgggagcca 240
 tttgcctctg ggaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
 tttgtagaag ggatatacaa agtggaata gacaccaaat cttactggaa gtgtcttggc 360
 atctccccat tccatgagca tgcagagggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
 cgctacacca ttgccgccct gctgagcccc tactcctatt ccaccacggc tgcctgcacc 480
 aatccaagg aataa 495

<210> 13
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13
 atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggggtggga 60
 ggggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
 ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcaaagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
 cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctg ctgatgacac ctgggagcca 240
 tttgcctctg ggaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
 tttgtagaag ggatatacaa agtggaata gacaccaaat cttactggaa ggcacttgc 360
 atctccccat tccatgagca tgcagagggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
 cgctacacca ttgccgccct gctgagcccc tactcctatt ccaccacggc tgcctgcacc 480
 aatccaagg aataa 495

<210> 14
 <211> 489
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 14
 atgtctgttt ctgaaatcca gctgatgcat aacctgggta aacatctgaa ctctatggaa 60
 cgtgttgaat ggctgcgtaa gaaactgcag gacgttcata actttgggcc aactggtacc 120
 ggtgaatcca aggtcctct gatggtcga gttctagatg ctgtccgagg cagtcttgcc 180
 atcaatgtgg ccgtgcatgt gttcagaaag gctgctgatg acacctggga gccatttgcc 240
 tctgggaaaa ccagtgagtc tggagagctg catgggctca caactgagga ggaatttgta 300
 gaagggatat acaaagtgg aatagacacc aaatcttact ggaagtgtct tggcatctcc 360
 ccattccatg agcatgcaga ggtggtattc acagccaacg actccggccc ccgccgctac 420
 accattgccg ccctgctgag cccctactcc tattccacca cggctgtcgt caccaatccc 480
 aaggaataa 489

<210> 15
 <211> 843
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 15

ES 2 400 341 T3

atgCGaccgt cgggccgtaa gagctccaaa atgcaggctt tccgtatctg ggacgttaac 60
cagaaaacct tctacctgCG caacaaccag ctggttGctg gctacctgca gggTccgaac 120
gttaacctGg aagaaaaaat cGacgttGta ccgatcgaac cgcacgctct gttcctgggt 180
atccacggTg gtaaaatGtg cctgagctGc gtgaaatctg gtgacgaaac tCGtctGcag 240
ctggaagcag ttaacatcac tgacctgagc gaaaaccgca aacaggacaa acgtttcGca 300
ttcatccgct ctgacagcgg cccgaccacc agcttcgaat ctgctgcttg cccgggttg 360
ttcctgtGca ctgctatgga agctgaccag ccggtagcc tgaccaacat gccggacgaa 420
ggcgtgatgg taaccaaatt ctactccag gaagacgaag gtccaactgg taccggtgaa 480
tccaaggctc ctctgatggT caaagttcta gatgctgtcc gaggcagtc tGCCatcaat 540
gtggccgtGc atgtgttcag aaaggctgct gatgacacct gggagccatt tgcctctggg 600
aaaaccagtg agtctggaga gctgcatggg ctCacaactg aggaggaatt tGtagaaggg 660
atatacaaag tggaaataga caccaaattc tactggaagg cacttgGcat ctccccattc 720
catgagcatg cagaggTggT attcacagcc aacgactccg gccccgccg ctacaccatt 780
gccgcccTgc tgagccccta ctctatttc accacggctg tCGtaccaa tcccaaggaa 840
taa 843

5 <210> 16
<211> 855
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 16
atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gctcctctga tggTcaaagt tctagatgct 60
gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
acctgggagc catttgctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
actgaggagg aatttGtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggTattcac agccaacgac 300
tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccag 360
gctgtcgtca ccaatcccaa ggaaggtagt ggtagccgac cgtccggccg taagagctcc 420
aaaatgcagg ctttccgtat ctgggacgtt aaccagaaaa cttctacct gcgcaacaac 480
cagctggttg ctggctacct gcagggtccg aacgttaacc tggaaagaaa aatcgacgtt 540
gtaccgatcG aaccgcacgc tctgttcctg ggtatccagc gtggTaaaat tgcctgagc 600
tgctgaaat ctggtgacga aactcgtctg cagctggaag cagttaacat cactgacctg 660
agcGaaaacc gcaaacagga caaacgttc gcattcatcc gctctgacag cggccccgacc 720
accagcttcg aatctgctgc ttgccgggt tggttcctgt gactgctat ggaagctgac 780
cagccggtaa gcctgaccaa catgccggac gaaggcgtga tggtaacca attctacttc 840
caggaagacg aataa 855

10 <210> 17
<211> 439
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

ES 2 400 341 T3

catatgggtc caactggtac cggatgaatcc aaggctcctc tgatgggtcaa agttctagat 60
 gctgtccgag gcagtcctgc catcaatgtg gccgtgcatg tgttcagaaa ggctgctgat 120
 gacacctggg agccatttgc ctctgggaaa accagtgagt ctggagagct gcatgggctc 180
 acaactgagg aggaatttgt agaagggata tacaaagtgg aatagacac caaatcttac 240
 tggaaggcac tttgcatctc cccattccat gagcatgcag aggtggtatt cacagccaac 300
 gactccggcc cccgccgcta caccattgcc gccctgctga gccctactc ctattccacc 360
 actgcagtcg tcaccaatcc caaggaagga tcaggatccg gaaaacgtcc gccgggtttc 420
 tccccgctgt aatctcgag 439

5 <210> 18
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18

gaggaataac atatgggtcc aactggtacc ggtgaa 36

10 <210> 19
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 19

cgcggatcc tcgagattat tcctgggat tggatga 36

15 <210> 20
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

20 gaggaataac atatgggtcc aactggtacc ggtgaatcca aggtcct 48
 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 21

agaaaggctt gtgatgacac ctgg 24

30 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

ccagggtgca tcacaagcct ttct 24

35 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

agaaaggctg ctgtgacac ctgg 24

<210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 24
 ccaggtgtca caagcagcct ttct 24
 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 25
 tactggaagt gtcttgcat ctcc 24
 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26
 ggagatgccca agacacttcc agta 24
 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27
 aaggcacttt gcatctcccc attc 24
 25 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28
 30 gaatggggag atgcaaagtg cctt 24
 <210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 29
 ctgatggtcg cagttctaga t 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 30
 atctagaact gcgaccatca g 21
 <210> 31
 <211> 36
 45 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*
 <400> 31
 gaggaataac atatgatcga aggtccgact ctgcgt 36
 <210> 32
 5 <211> 41
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32
 ttcaccggta ccagttggac ctgcgcgtgc tgcaagccat t 41
 10 <210> 33
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33
 15 gaggaataac atatgtctgt ttctgaaatc cag 33
 <210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 34
 ttcaccggta ccagttggac caaagttatg aacgtc 36
 <210> 35
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35
 gaggaataac atatgcgacc gtccggacgt aa 32
 <210> 36
 <211> 36
 30 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 36
 ttctacttcc aggaagacga aggtccaact ggtacc 36
 <210> 37
 35 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37
 gtctcacca atccaagga aggtagtggg agccgaccgt ccggccgtaa gagc 54
 40 <210> 38
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38

ES 2 400 341 T3

	ccgcgcatcc tcgagattat tcgtcttct ggaagtagaa	40
	<210> 39	
	<211> 36	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 39	
	gaggaataac atatgggtcc aactggtacc ggtgaa	36
	<210> 40	
	<211> 26	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 40	
	aatatactgc agtgggtgaa taggag	26
	<210> 41	
15	<211> 68	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 41	
	gtcgtcacca atccaagga aggatcagga tccggaaaac gtccgccggg tttctcccg	60
	ctgtaatc	68
20	<210> 42	
	<211> 76	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 42	
	tcgagattac agcggggaga aaccggcgg acgttttccg gatcctgac cttccttggg	60
25	attggtgacg actgca	76
	<210> 43	
	<211> 489	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 43	
	atgtctgttt ctgaaatcca gctgatgcat aacctgggta aacatctgaa ctctatggaa	60
	cgtgttgaat ggctgctgaa gaaactgcag gacgttcata actttgggcc aactggtacc	120
	ggtgaaatcca aggtcctct gatggtcga gttctagatg ctgtccgagg cagtctgcc	180
	atcaatgtgg ccgtgcatgt gttcagaaag gctgctgatg acacctggga gccatttgcc	240
	tctgggaaaa ccagtgagtc tggagagctg catgggctca caactgagga ggaatttcta	300
	gaagggatat acaaagtgga aatagacacc aatcttact ggaagtgtct tggcatctcc	360
	ccattccatg agcatgcaga ggtggtattc acagccaacg actccggccc ccgccgtac	420
	accattgccg ccctgctgag cccctactcc tattccacca cggctgtcgt caccaatccc	480
	aaggaataa	489

ES 2 400 341 T3

<210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 44
 cgtacagggt tacgcaagaa aatgg 25
 <210> 45
 <211> 62
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 45
 ggattcaccg gtaccagttg gaccaccacc accaccacca cccgactgc ctgaaccaga 60
 gc 62
 <210> 46
 <211> 71
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 46
 tgactaagcc atatgaaaca tcataccat caccatcatg acgaagttga tcacggtgaa 60
 ggtactttca c 71
 <210> 47
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 47
 ggattcaccg gtaccagttg gaccaccacc accaccaccg ctac 44
 25 <210> 48
 <211> 594
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 48
 atgaaacatc atcaccatca ccatcatgac gaagttgatc acggtgaagg tactttcact 60
 tctgacgttt cttcttatct ggaaggtcag gctgctaaag aattcatcgc ttggctggtt 120
 30 aaaggtcgtg gtggttctgg ttctgctact ggtggttccg gctccaccgc aagctctggt 180
 tcaggcagtg cgggtggtgg tgggtggtgg ggtccaactg gtaccggtga atccaaggct 240
 cctctgatgg tcaaagttct agatgctgtc cgaggcagtc ctgccatcaa tgtggccgtg 300
 catgtgttca gaaaggctgc tgatgacacc tgggagccat ttgcctctgg gaaaaccagt 360
 gagtctggag agctgcatgg gctcacaact gaggaggaat ttgtagaagg gatatacaaa 420
 gtggaaatag acaccaaatc ttactggaag gcactttgca tctccccatt ccatgagcat 480
 gcagaggtgg tattcacagc caacgactcc ggcccccgcc gctacaccat tgccgcctg 540
 ctgagcccct actcctattc caccacggct gtcgtcacca atcccaagga ataa 594
 <210> 49
 <211> 591

ES 2 400 341 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

atgaaacatc atcaccatca ccatcatgac gaagttgac acggtgaagg tactttcact 60
 tctgacgttt cttcttatct ggaaggtcag gctgctaaag aattcatcgc ttggctggtt 120
 aaaggtcgtg gtggtggtgg tggttctggt ggtggtggt ctggtggtgg tggttctggc 180
 ggcggtggta gcggtggtgg tgggtggtgg ccaactggta ccggtgaatc caaggctcct 240
 ctgatggtcg cagttctaga tgctgtccga ggcagtcctg ccatcaatgt ggccgtgcat 300
 gtgttcagaa aggctgctga tgacacctgg gagccatttg cctctgggaa aaccagtgag 360
 tctggagagc tgcattggct cacaactgag gaggaatttg tagaaggat atacaaagt 420
 gaaatagaca ccaaacttta ctggaaggca ctttgcatct cccattcca tgagcatgca 480
 gaggtggtat tcacagcaa cgactccggc cccgccgct acaccattgc cgccctgctg 540
 agcccctact cctattccac cacggtgtc gtcaccaatc ccaaggaata a 591

5 <210> 50
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

agacctgtac atatgaaaca tcatcacat caccatcatg acgaagttga tcacggtgaa 60

10 ggtactttca cttctg 76

<210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 51

gggggaagag gaaaactgac 20

<210> 52
 <211> 894
 <212> ADN
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

ES 2 400 341 T3

atgaaacatc atcaccatca ccatcatgac gaagttgatc acggtgaagg tactttcact 60
tctgacgttt cttcttatct ggaaggtcag gctgctaaag aattcatcgc ttggctggtt 120
aaaggtcgtg gtggttctgg ttctgctact ggtggttccg gctccaccgc aagctctggt 180
tcaggcagtg cgactcatgg tgggtggtgg ggtgacaaaa ctcacacatg tccaccgtgc 240
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gttttcctct tcccccaaa acccaaggac 300
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 360
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 420
aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 480
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agcctccca 540
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 600
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 660
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 720
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag 780
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 840
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 894

<210> 53
<211> 60
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*
<400> 53

gtcgtcacca atccaagga aggttctggc tccgatcag ggggaccgtc agtttctct 60

<210> 54
<211> 52
10 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 54

ccgcgatcc tcgagattag gatccagaac ccccttggc ttggagatg gt 52

<210> 55
<211> 42
15 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 55

gaggaataac atatgggtcc aactgttacc ggtgaatcca ag 42

<210> 56
<211> 735
20 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 56

ES 2 400 341 T3

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggtaaagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
 acctgggagc catttgccctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggccccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatcccaa ggaaggttct ggctccggat cagggggacc gtcagttttc 420
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 480
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 540
 gtggagggtc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 600
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 660
 aaggctcca acaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 720
 ggttctggat cctaa 735

<210> 57
 <211> 843
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 57
 atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tgggtggcgg 60
 ggggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
 ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcaaagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
 cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctg ctgatgacac ctgggagcca 240
 tttgcctctg ggaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
 tttgtagaag ggatatacaa agtggaata gacaccaa cttactggaa ggcaactggc 360
 atctccccat tccatgagca tgcagaggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
 cgctacacca ttgccgccct gctgagcccc tactcctatt ccaccacggc tgcgtcacc 480
 aatcccaagg aaggttctg ctccggatca gggggaccgt cagttttcct cttccccca 540
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 600
 gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 660
 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 720
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 780
 aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggg ttctggatcc 840
 taa 843

<210> 58
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 58
 gaggaataag gatccatcga aggtccgact ctgcg 35

15 <210> 59
 <211> 843
 <212> ADN

ES 2 400 341 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

```

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctcttga tggtaaagt tctagatgct    60
gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac    120
acctgggagc catttgccct tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca    180
actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg    240
aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac    300
tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg    360
gctgtcgtca ccaatcccaa ggaaggttct ggctccggat cagggggacc gtcagttttc    420
ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc    480
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc    540
gtggagggtg ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt    600
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc    660
aaggctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg    720
ggttctggat ccatcgaagg tccgactctg cgtcagtggc tggctgctcg tgctggcggt    780
ggtggcggag ggggtggcat tgagggccca acccttcgcc aatggcttgc agcacgcgca    840
taa                                                                    843

```

5 <210> 60
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 60

```

ttcaccggtg ccagttggac cagaaccccc ttggctttg gagatggt    48

```

10 <210> 61
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 61

```

gaggaataac atatgggatc cggttctggg ggaccgtcag ttttctc    48

```

15 <210> 62
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 62

ES 2 400 341 T3

atgggatccg gttctggggg accgtcagtt ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120
cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc 300
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggggttctg gtccaactgg taccggtgaa 360
tccaaggctc ctctgatggt caaagttcta gatgctgtcc gaggcagtcc tgccatcaat 420
gtggccgtgc atgtgttcag aaaggctgct gatgacacct gggagccatt tgcctctggg 480
aaaaccagtg agtctggaga gctgcatggg ctcaacaactg aggaggaatt tgtagaaggg 540
atatacaaaag tggaaataga caccaaatct tactggaagg cacttggcat ctccccattc 600
catgagcatg cagaggtggt attcacagcc aacgactccg gccccgccg ctacaccatt 660
gccgccctgc tgagccccta ctctatttcc accacggctg tcgtcaccaa tcccaaggaa 720
taa 723

<210> 63
<211> 33
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*
<400> 63

gaggaataac atatgatcga aggtccgact ctg 33

<210> 64
<211> 36
10 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 64

taacatatgg gatcctgcgc gtgctgcaag ccattg 36

<210> 65
15 <211> 831
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 65

ES 2 400 341 T3

atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggggtggcga 60
 ggggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggatccggt 120
 tctgggggac cgtcagtttt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 180
 cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag 240
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 300
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 360
 aatggcaagg agtacaagtg caaggctccc acaaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 420
 accatctcca aagccaaagg gggttctggt ccaactggta ccggtgaatc caaggctcct 480
 ctgatggtca aagttctaga tgctgtccga ggcagtcctg ccatcaatgt ggccgtgcat 540
 gtgttcagaa aggctgctga tgacacctgg gagccatttg cctctgggaa aaccagtgag 600
 tctggagagc tgcatgggct cacaactgag gaggaatttg tagaagggat atacaaagtg 660
 gaaatagaca ccaaatctta ctggaaggca cttggcatct cccattcca tgagcatgca 720
 gaggtggtat tcacagccaa cgactccggc ccccgccgct acaccattgc cgccctgctg 780
 agcccctact cctattccac cacggctgtc gtcaccaatc ccaaggaata a 831

<210> 66
 <211> 42
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

gtcgtacca atccaagga aggttctggt tctggtatcg aa 42

<210> 67
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 67

ccgcgatcc tcgagattat gcgctgctg caagccattg 40

<210> 68
 <211> 510
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 68

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag tgcctctga tggtaaagt tctagatgct 60
 gtccgaggca gtccctgcat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
 acctgggagc catttgcttc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
 actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
 aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
 tccggcccc gccgtacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta tccaccacg 360
 gctgtcgtca ccaatccaa ggaaggttct ggttctggta tcgaaggccc gactctgcgt 420
 cagtggctgg ctgctcgtgc tggcgggtgt ggcggagggg gtggcattga gggcccaacc 480
 20 cttcgccaat ggcttgacg acgcgcataa 510

<210> 69
 <211> 510

ES 2 400 341 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 69

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggctgcagt tctagatgct 60
gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
acctgggagc catttgccctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
gctgtcgtca ccaatcccaa ggaaggttct ggttctggta tcgaaggcc gactctgcgt 420
cagtggctgg ctgctcgtgc tggcgggtgt ggcggagggg gtggcattga gggcccaacc 480
cttcgccaat ggcttgacg acgcgcataa 510

5 <210> 70
<211> 510
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 70

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggctgcagt tctagatgct 60
gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc ttgtgatgac 120
acctgggagc catttgccctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
aaggcacttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
gctgtcgtca ccaatcccaa ggaaggttct ggttctggta tcgaaggcc gactctgcgt 420
cagtggctgg ctgctcgtgc tggcgggtgt ggcggagggg gtggcattga gggcccaacc 480
cttcgccaat ggcttgacg acgcgcataa 510

10 <210> 71
<211> 510
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 71

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggctgcagt tctagatgct 60
gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
acctgggagc catttgccctc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
aagtgtcttg gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
gctgtcgtca ccaatcccaa ggaaggttct ggttctggta tcgaaggcc gactctgcgt 420
cagtggctgg ctgctcgtgc tggcgggtgt ggcggagggg gtggcattga gggcccaacc 480
cttcgccaat ggcttgacg acgcgcataa 510

<210> 72
<211> 510

ES 2 400 341 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

atgggtccaa ctggtaccgg tgaatccaag gtcctctga tggctgcagt tctagatgct 60
gtccgaggca gtcctgccat caatgtggcc gtgcatgtgt tcagaaaggc tgctgatgac 120
acctgggagc catttgcttc tgggaaaacc agtgagtctg gagagctgca tgggctcaca 180
actgaggagg aatttgtaga agggatatac aaagtggaaa tagacaccaa atcttactgg 240
aaggcacttt gcatctcccc attccatgag catgcagagg tggattcac agccaacgac 300
tccggcccc gccgctacac cattgccgcc ctgctgagcc cctactccta ttccaccacg 360
gctgtcgtca ccaatcccaa ggaaggttct ggttctggta tcgaaggctc gactctgcgt 420
cagtggctgg ctgctcgtgc tggcgggtgt ggcggagggg gtggcattga gggccaacc 480
cttcgccagt ggcttgacg acgcgcataa 510

5 <210> 73
<211> 495
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggaggcgg 60
gggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcgcagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
10 cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctg ctgatgacac ctgggagcca 240
tttgctctg gaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
ttttagaag gatatatac agtggaaata gacacaaat cttactggaa ggactttgc 360
atctccccat tccatgagca tgcagaggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
cgctacacca ttgccgccct gctgagcccc tactctatt ccaccacggc tgtcgtcacc 480
aatccaagg aataa 495

15 <210> 74
<211> 495
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggaggcgg 60
gggggtggca ttgagggccc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact 120
ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcgcagttc tagatgctgt ccgaggcagt 180
cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctg ctgatgacac ctgggagcca 240
tttgctctg gaaaaccag tgagtctgga gagctgcatg ggctcacaac tgaggaggaa 300
ttttagaag gatatatac agtggaaata gacacaaat cttactggaa gtgtcttggc 360
atctccccat tccatgagca tgcagaggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc 420
cgctacacca ttgccgccct gctgagcccc tactctatt ccaccacggc tgtcgtcacc 480
aatccaagg aataa 495

<210> 75
<211> 495

ES 2 400 341 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

```
atgatcgaag gtccgactct gcgtcagtgg ctggctgctc gtgctggcgg tggaggcgga      60
gggggtggca ttgagggcc aacccttcgc caatggcttg cagcacgcgc aggtccaact      120
ggtaccggtg aatccaaggc tcctctgatg gtcgcagttc tagatgctgt cggaggcagt      180
cctgccatca atgtggccgt gcatgtgttc agaaaggctt gtgatgacac ctgggagcca      240
tttgctctg gaaaaaccag tgagtctgga gagctcatg ggctcacaac tgaggaggaa      300
tttgtagaag ggatatacaa agtggaata gacaccaaatt cttactggaa ggcacttggc      360
atctcccat tccatgagca tgcagagggtg gtattcacag ccaacgactc cggccccgc      420
cgctacacca ttgccgcctt gctgagcccc tactcctatt ccaccacggc tgcgtcacc      480
aatccaagg aataa
```

5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de transtiretina (TTR) que comprende la secuencia aminoacídica que se expone en la SEQ ID NO: 1, que comprende una sustitución en la posición 10 de cisteína a alanina.
- 5 2. El polipéptido de TTR de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la sustitución de la alanina en la posición 37 por cisteína.
3. El polipéptido de TTR de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la sustitución del ácido aspártico en posición 38 por cisteína.
4. El polipéptido de TTR de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la sustitución de la alanina en posición 81 por cisteína.
- 10 5. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la sustitución de la glicina en posición 83 por cisteína.
6. El polipéptido de TTR de la reivindicación 2 o la reivindicación 5, que comprende adicionalmente la sustitución de la lisina en posición 15 por alanina.
- 15 7. El polipéptido de TTR de la reivindicación 1, en el que el polipéptido de TTR se modifica químicamente con un producto químico seleccionado del grupo consistente en dextrano, poli(n-vinilpirrolidona), polietilenglicoles, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polietoxilados y polivinilalcoholes.
8. El polipéptido de TTR de la reivindicación 7, en el que el polipéptido de TTR está modificado químicamente con polietilenglicol (PEG).
- 20 9. El polipéptido de TTR de la reivindicación 8, en el que el PEG tiene un peso molecular de entre 1 kDa y 100 kDa, incluyendo entre 5 kDa y 30 kDa.
10. Una proteína de fusión que comprende una proteína fusionada con el polipéptido de TTR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de TTR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 25 12. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de TTR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
13. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.

Figura 1

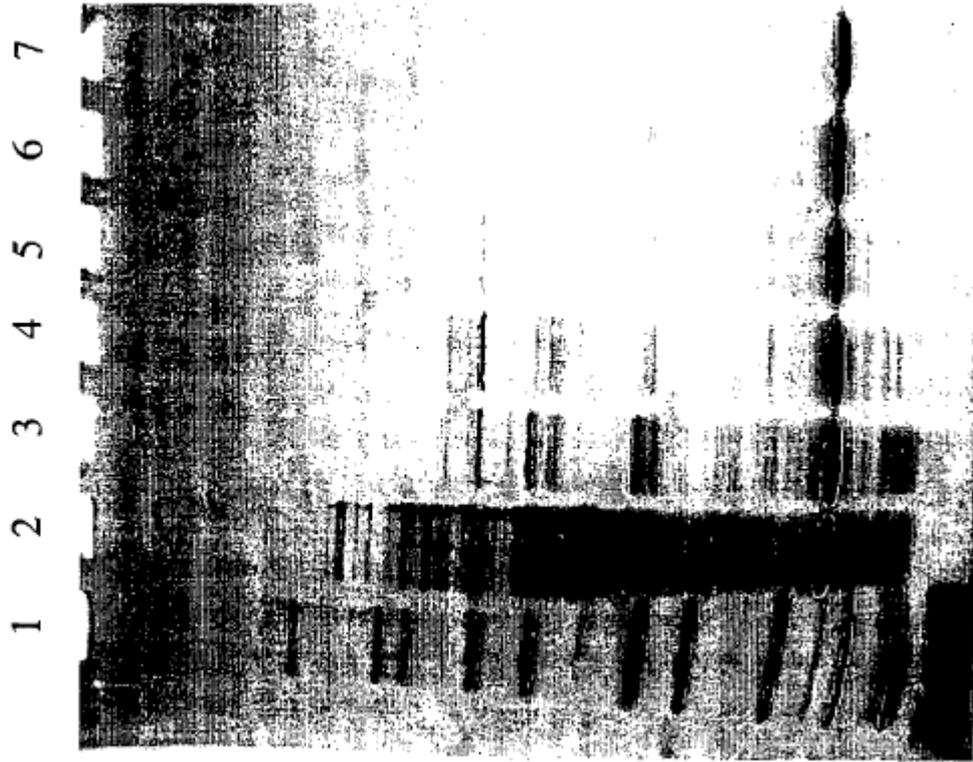


Figura 2

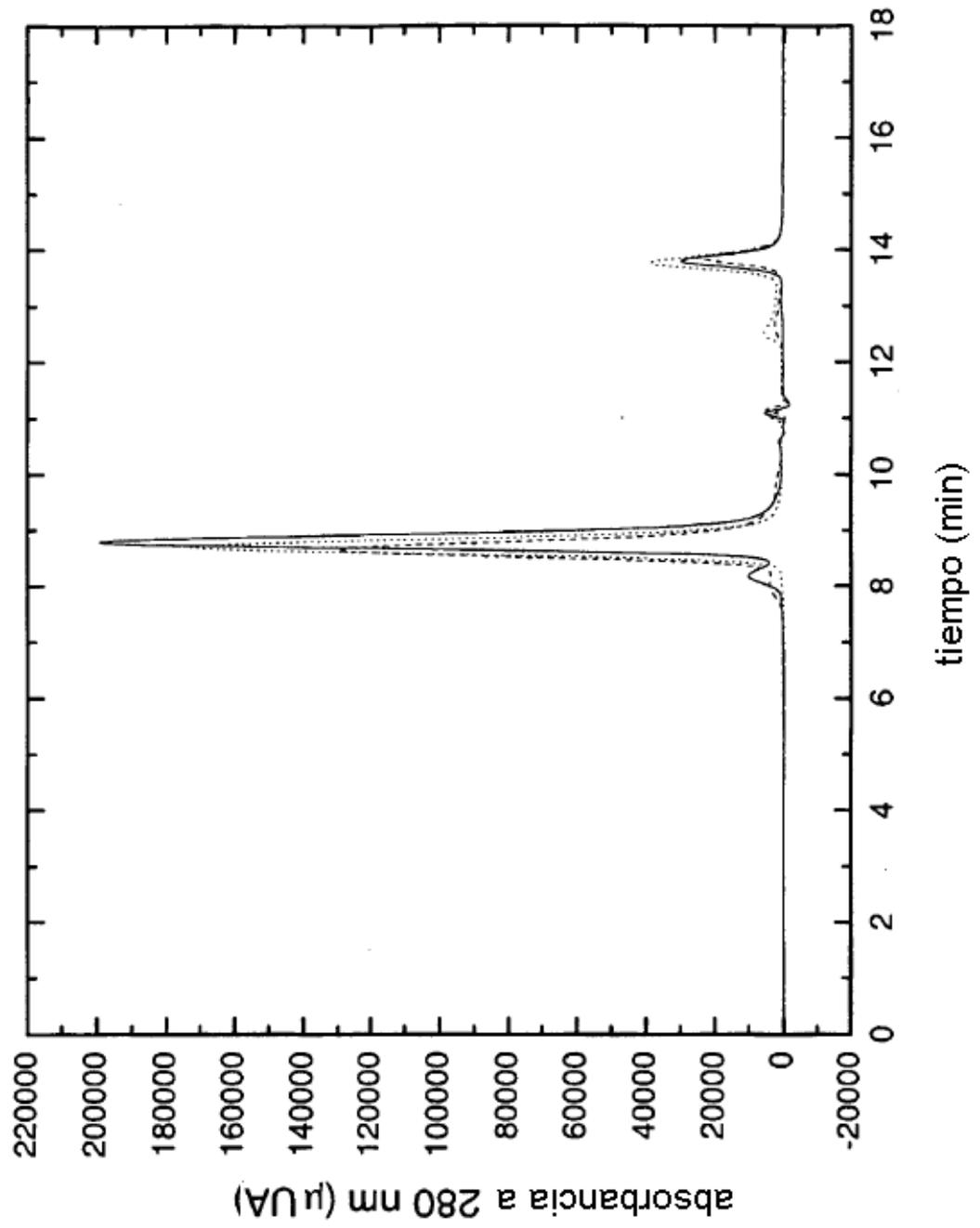


Figura 3

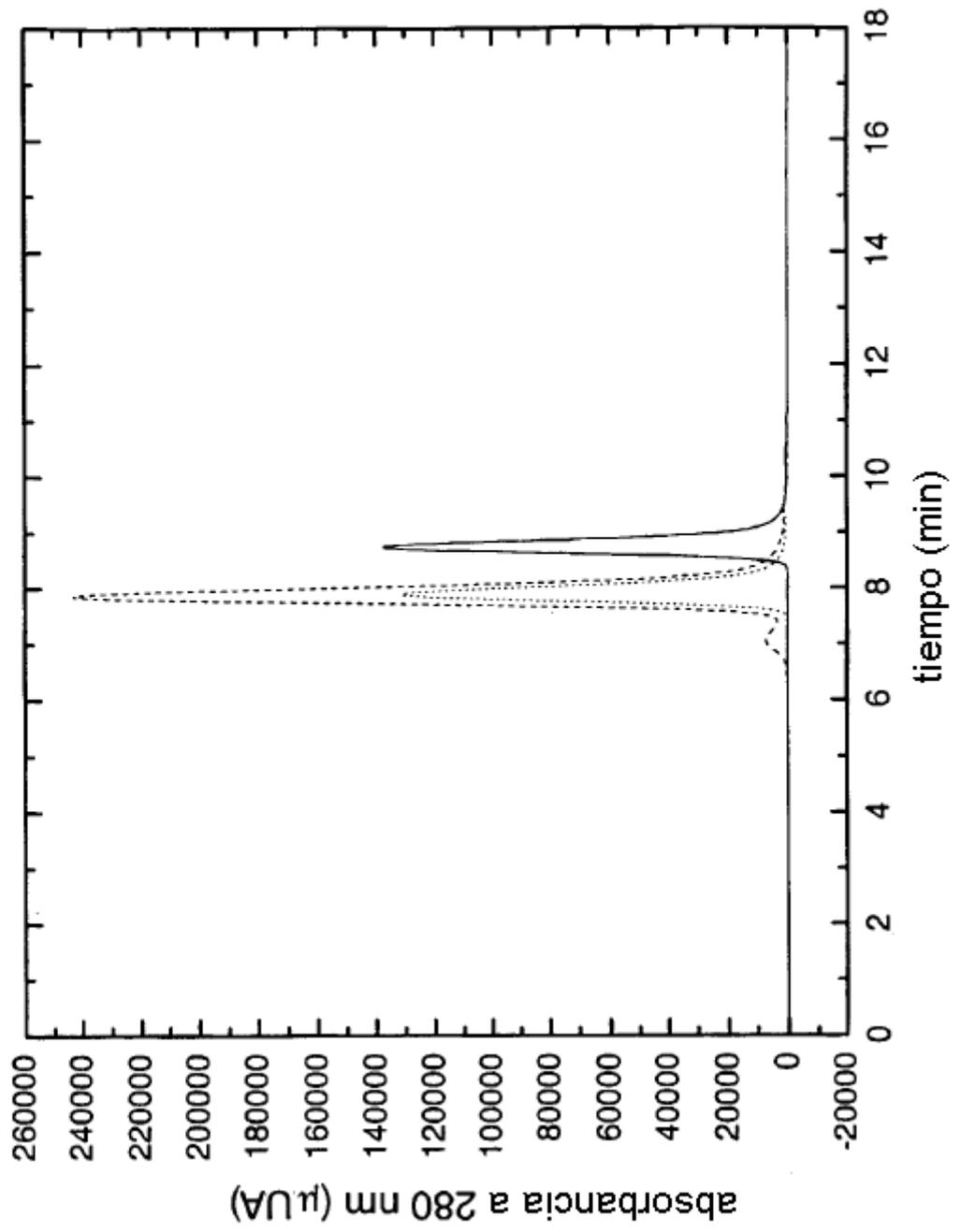


Figura 4

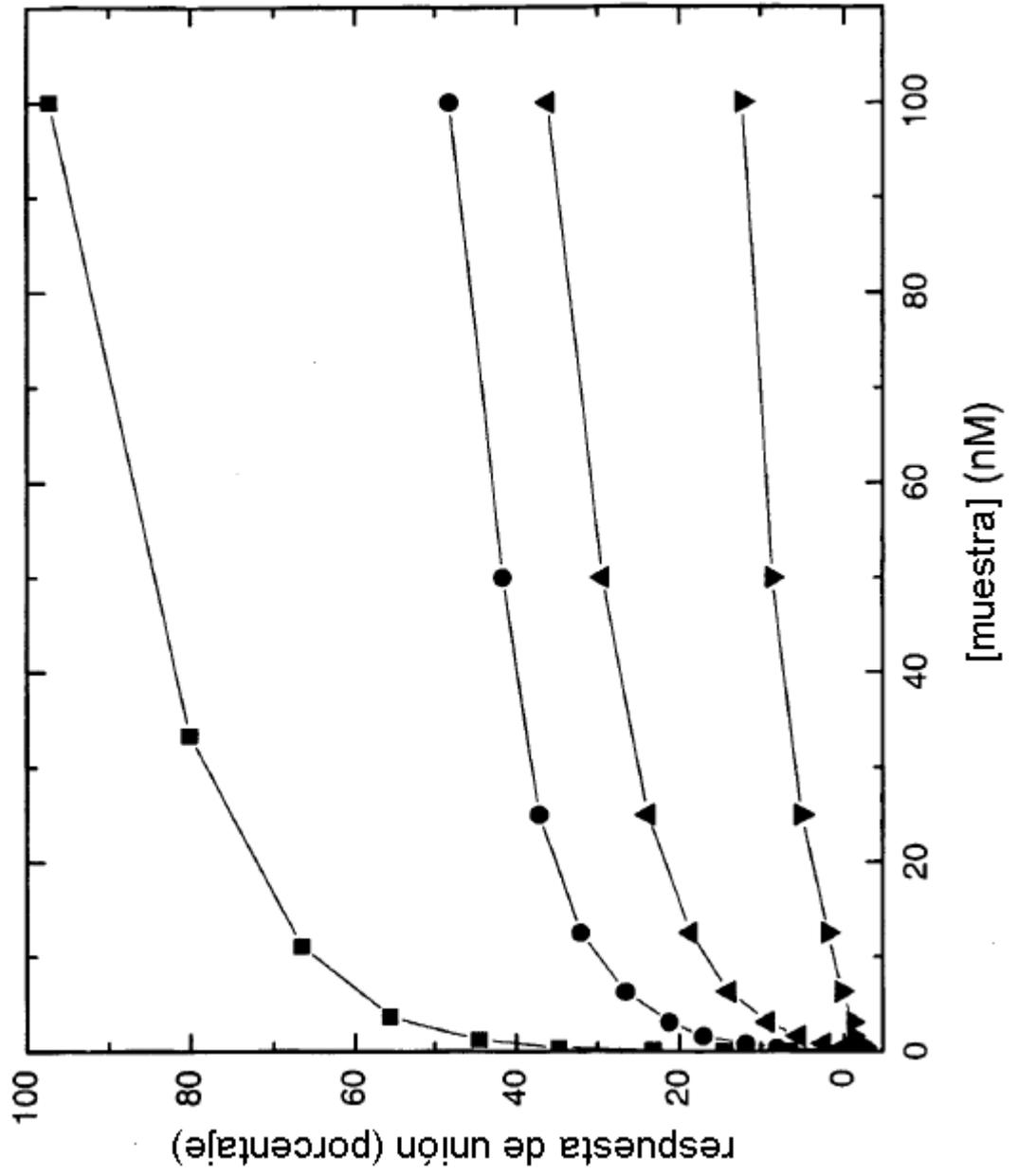


Figura 5

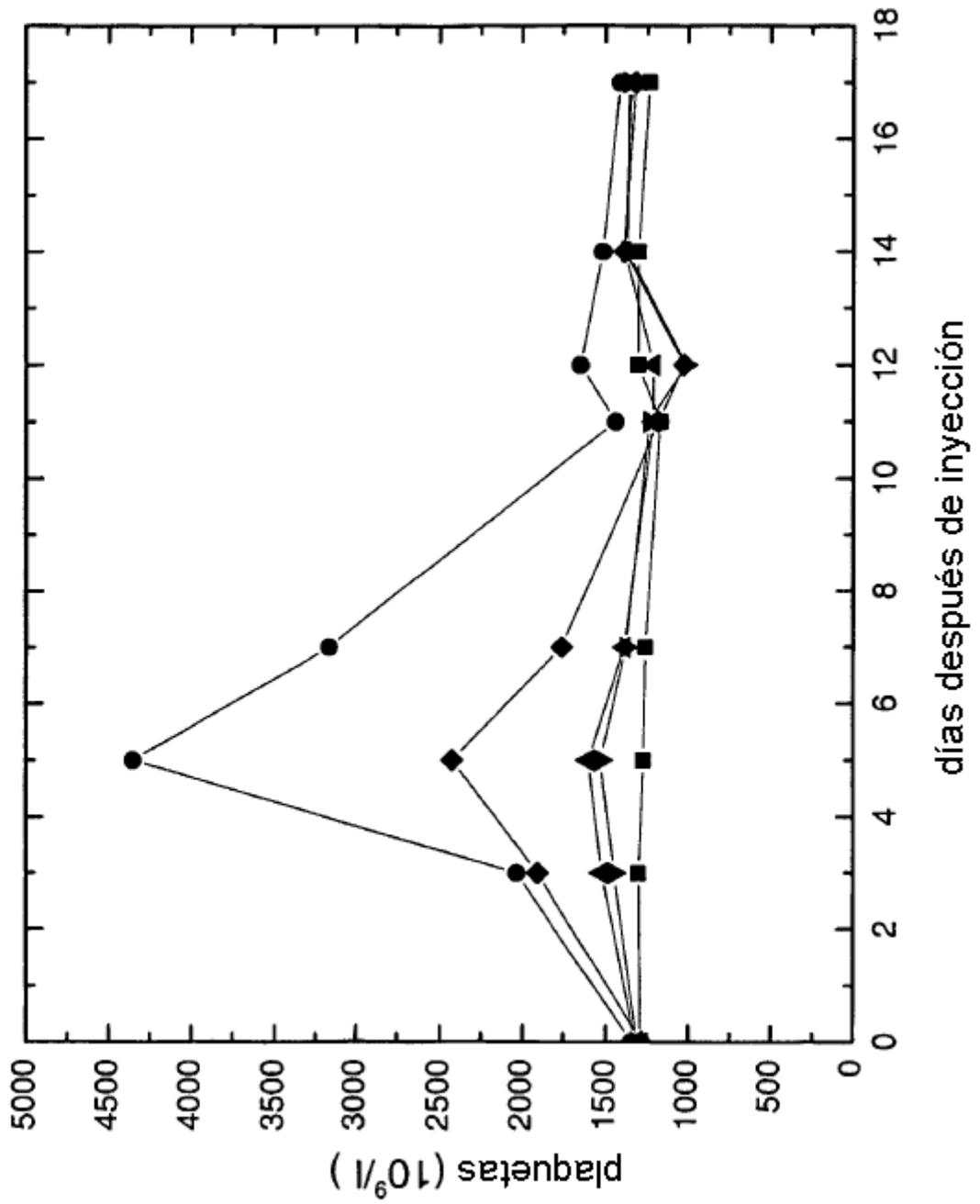


Figura 6

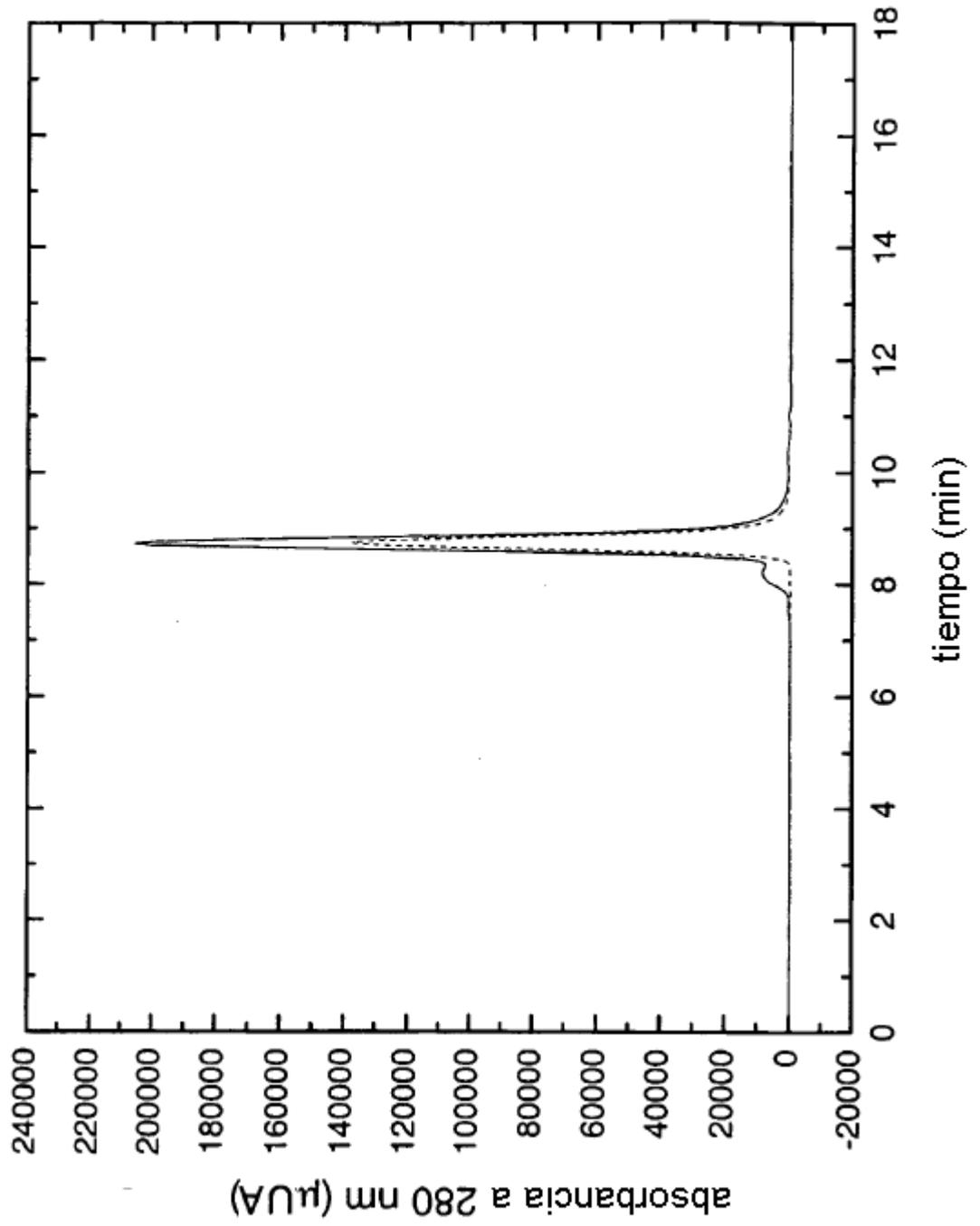


Figura 7

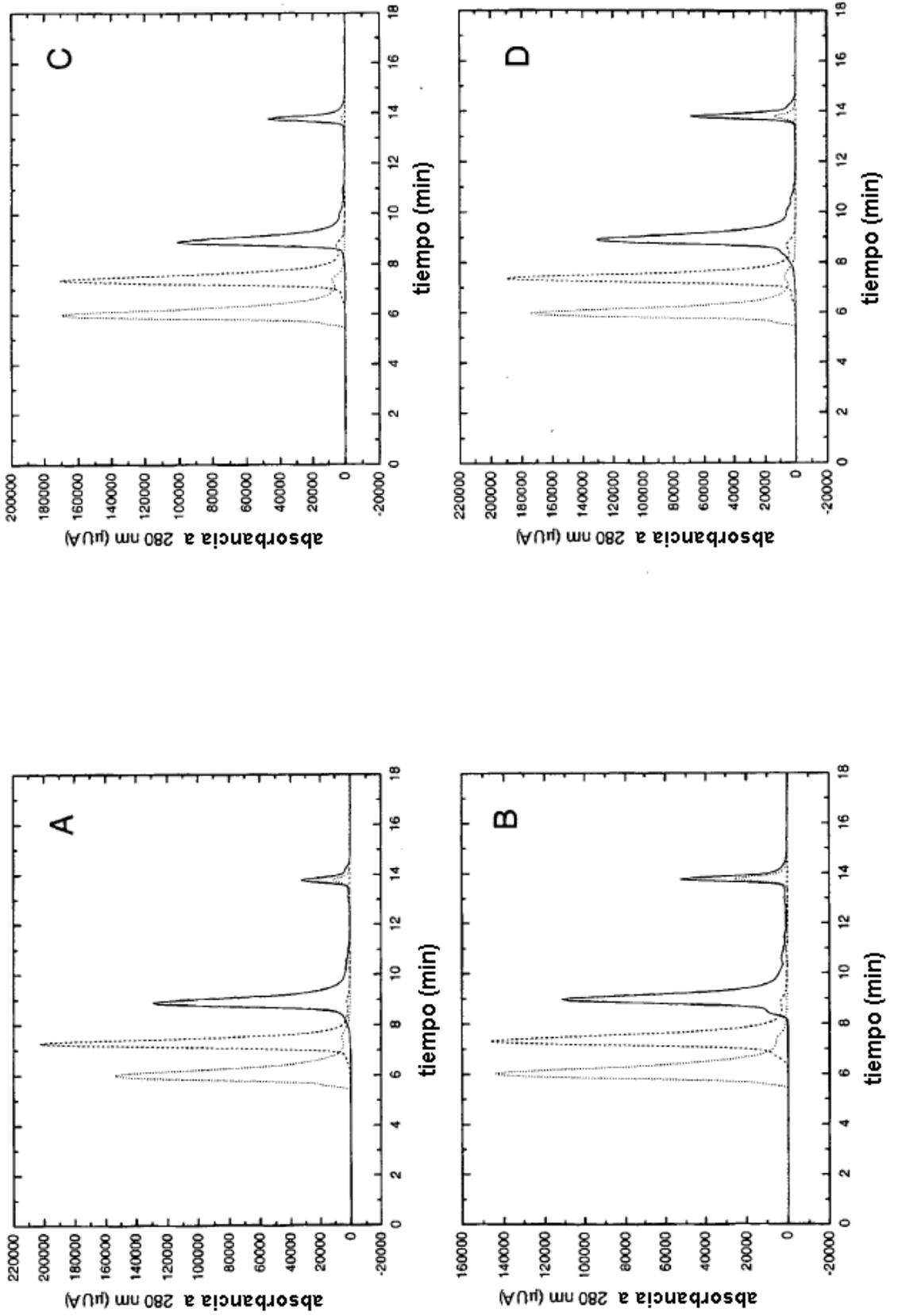


Figura 8

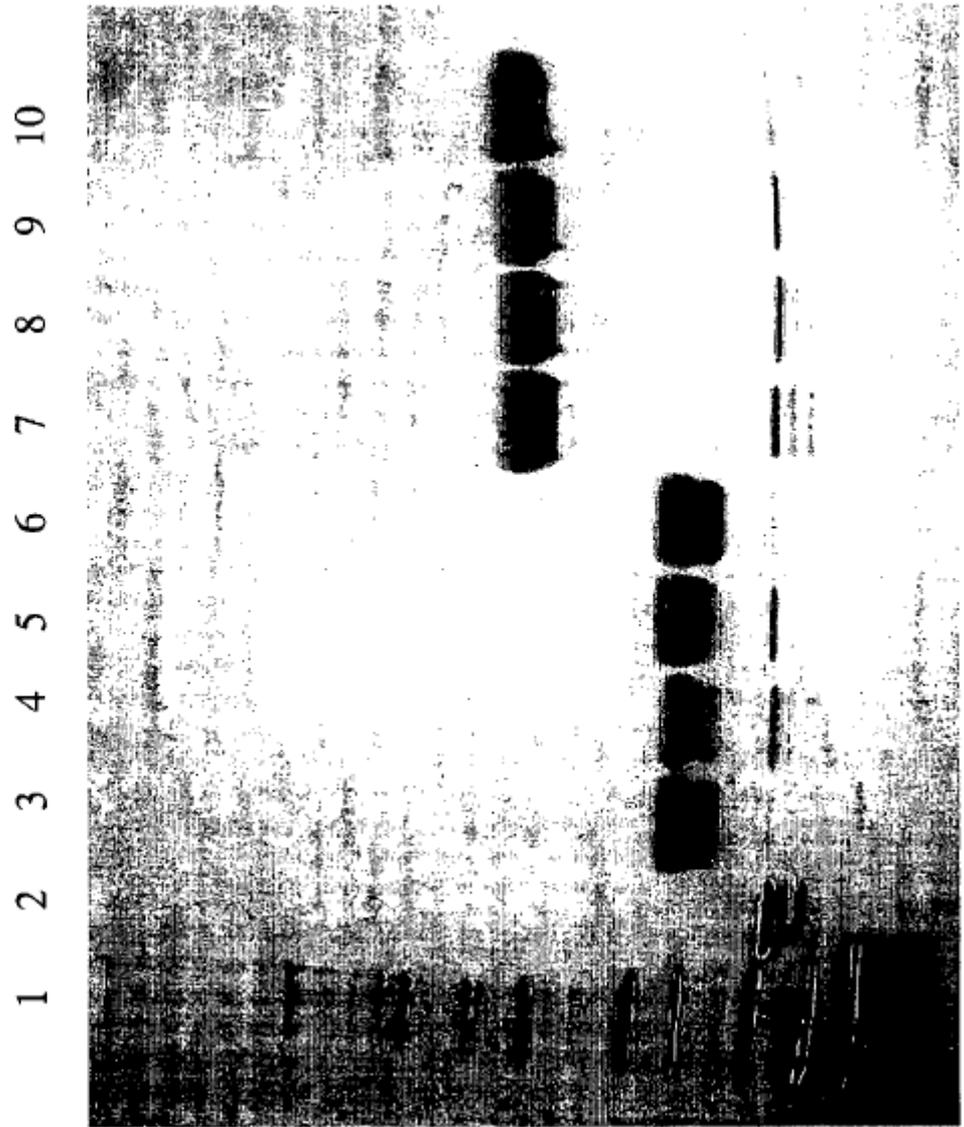


Figura 9

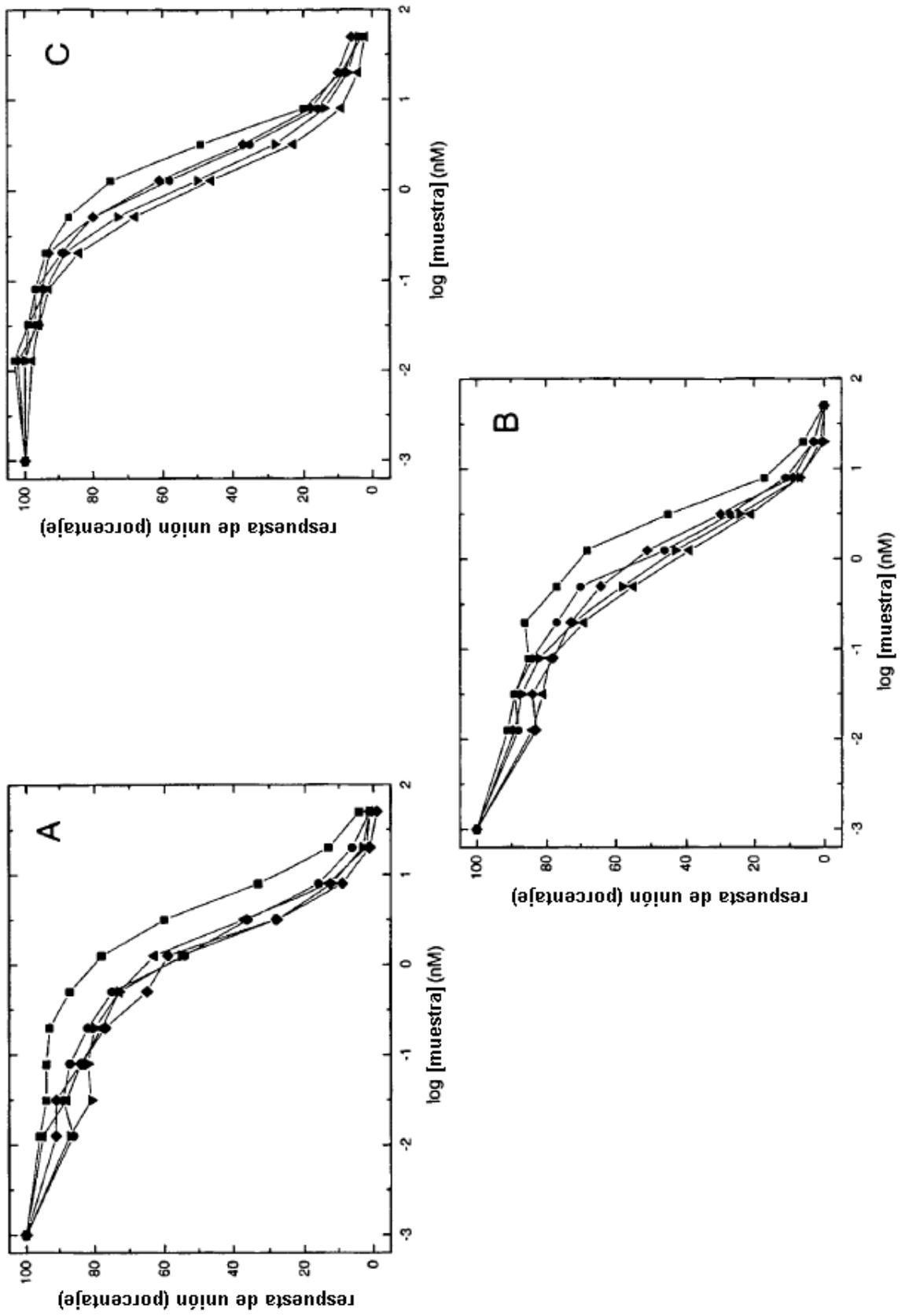


Figura 10

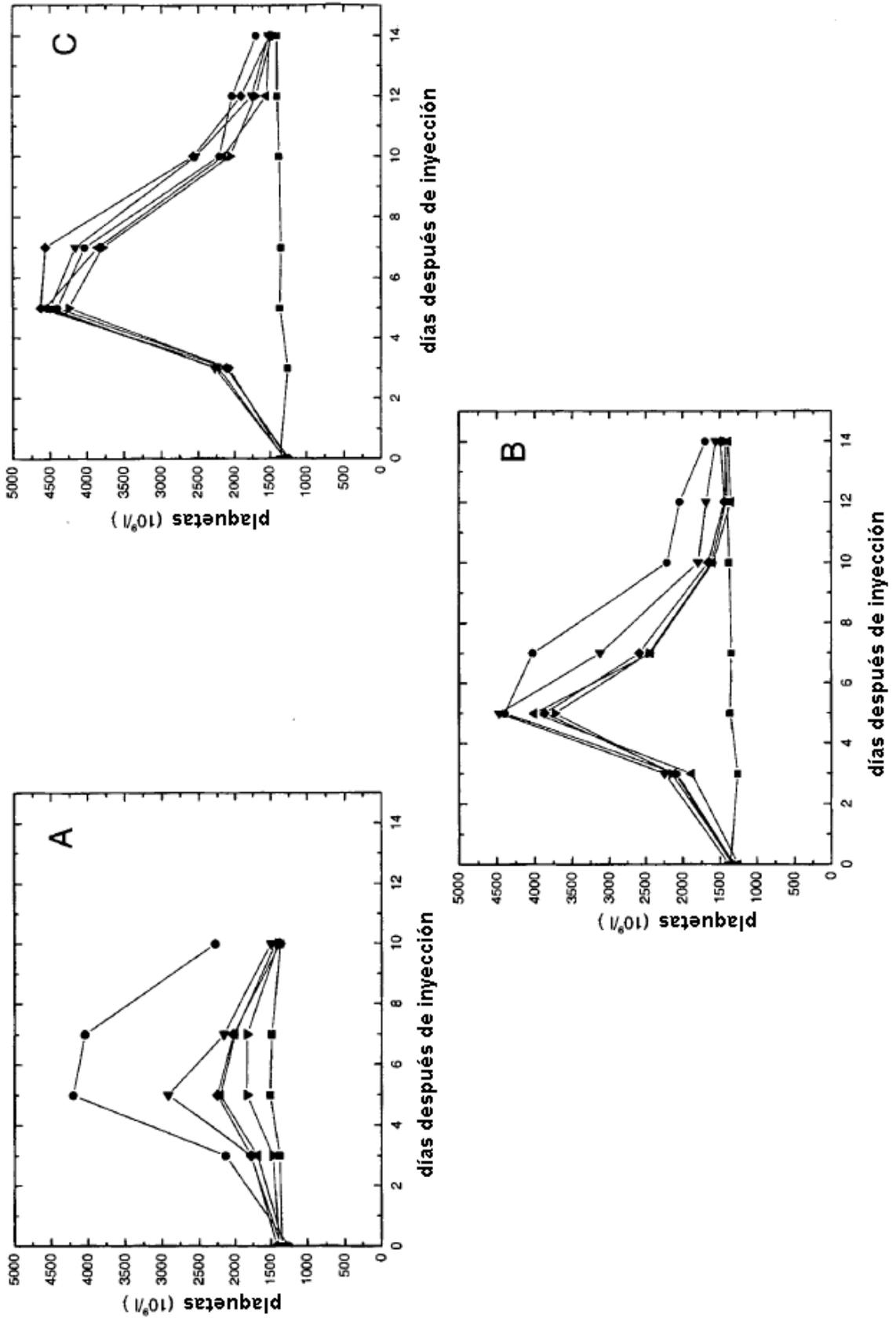


Figura 11

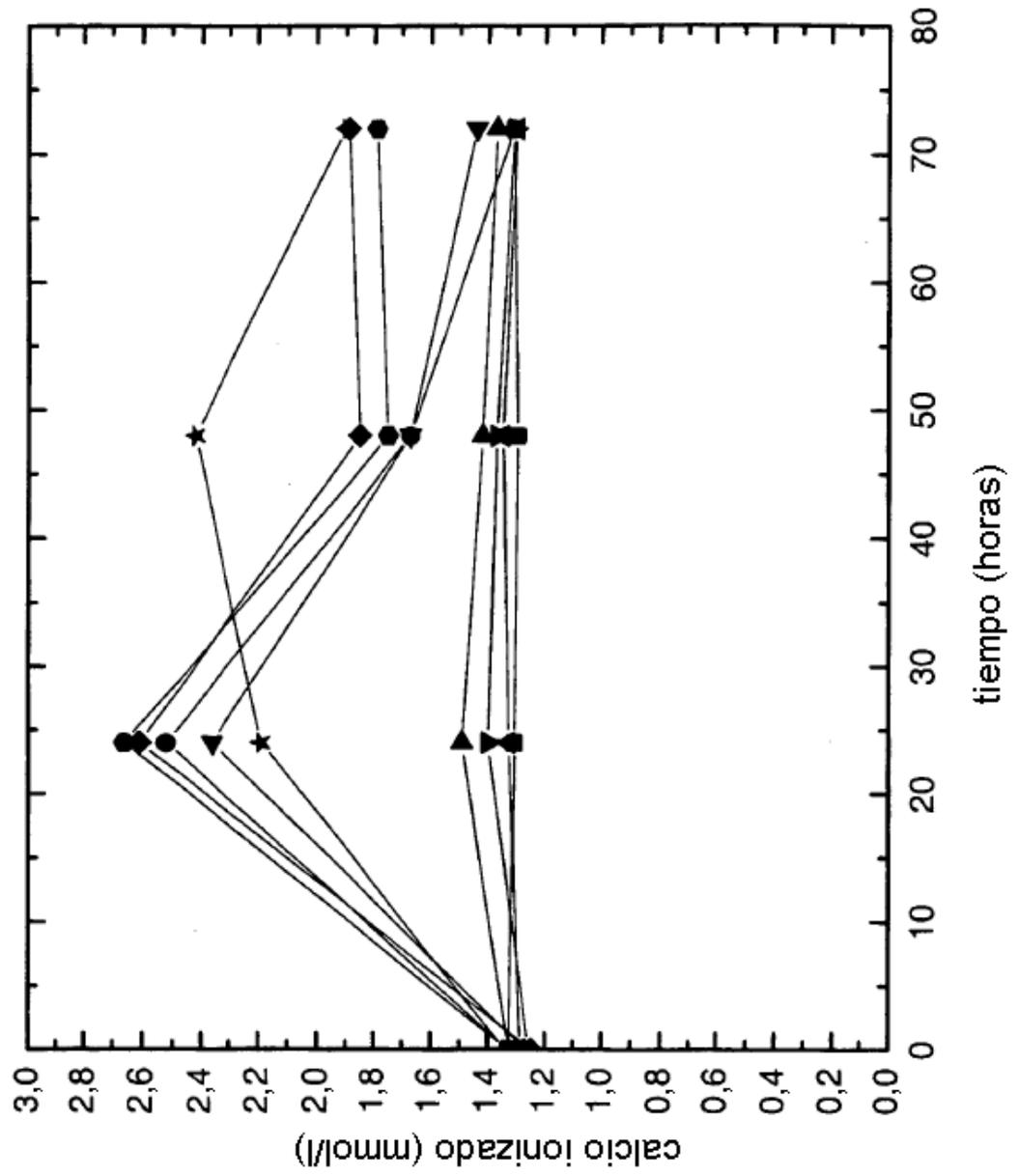


Figura 12

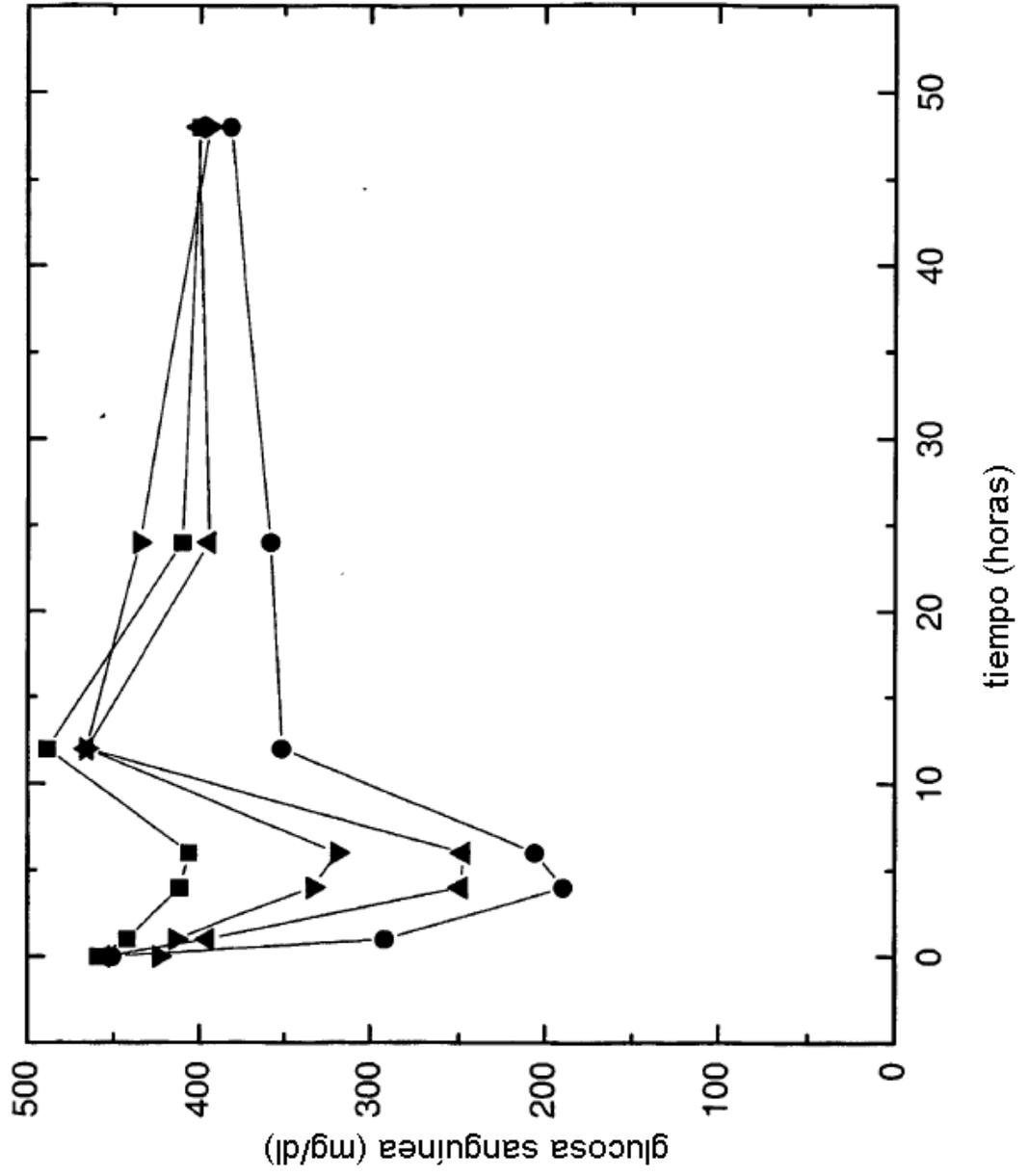


Figura 13

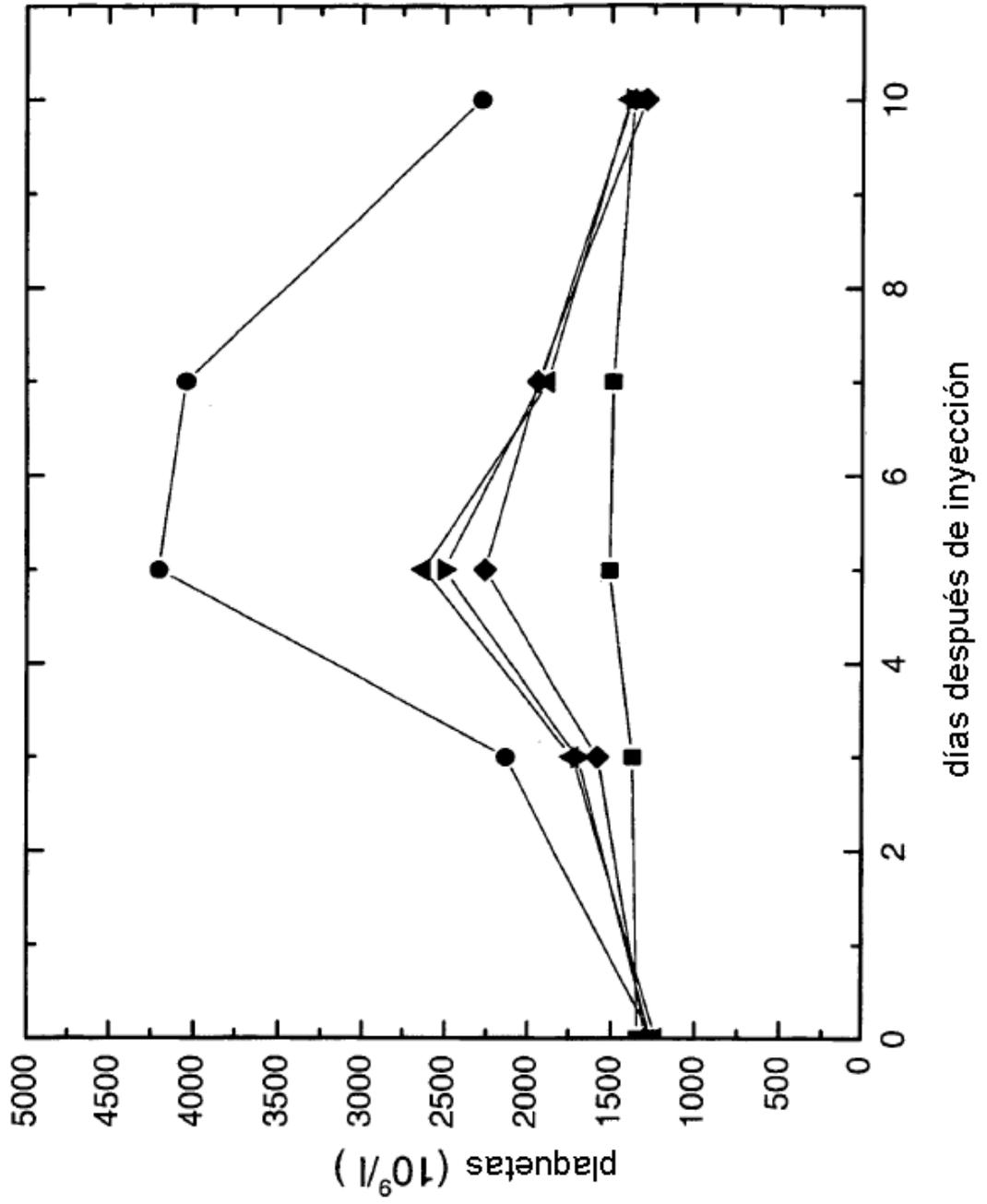


Figura 14

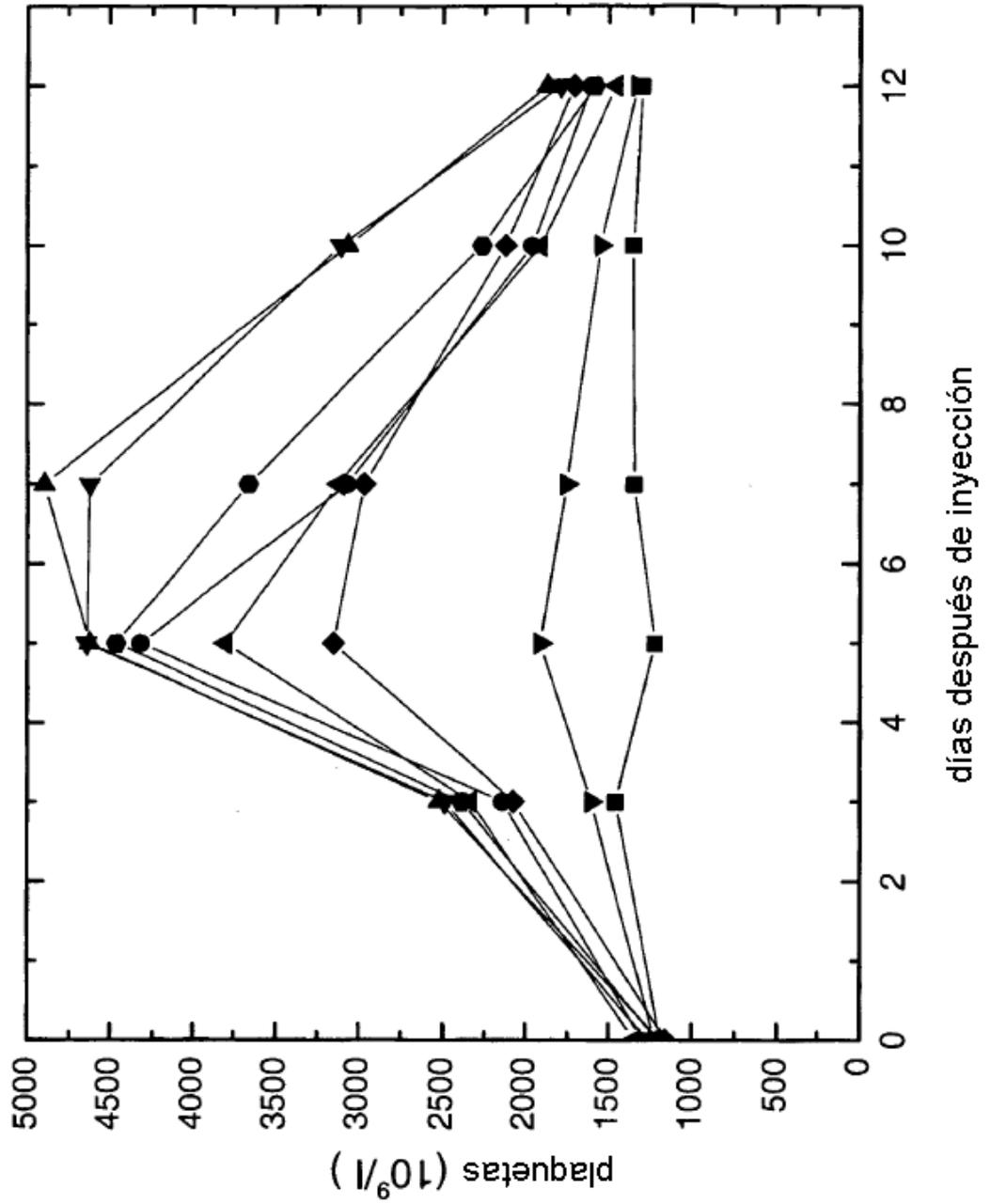


Figura 15

