

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 007**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/00** (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

**A61K 47/42** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2008 E 11158295 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2369005**

54 Título: **Proteínas activas biológicas que tienen estabilidad aumentada in vivo y/o in vitro**

30 Prioridad:

**14.05.2008 US 71705 P**  
**21.06.2007 EP 07012219**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.09.2013**

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN (100.0%)**  
**Arcisstrasse 21**  
**80290 München, DE**

72 Inventor/es:

**SKERRA, ARNE;**  
**THEOBALD, INA y**  
**SCHLAPSCHY, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 422 007 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas activas biológicas que tienen estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro*

La presente invención se refiere a proteínas biológicamente activas que comprenden al menos dos dominios en las que un primer dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica y un segundo dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido que forma una conformación de espiral al azar tal como se determina mediante medición de espectroscopía de dicroísmo circular (DC), mediante lo cual dicha conformación de espiral al azar media una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa. Además, se dan a conocer moléculas de ácido nucleico que codifican para las proteínas biológicamente activas de la invención y vectores y células que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico. Además, la presente invención proporciona composiciones que comprenden los compuestos de la invención así como para usos específicos de las proteínas biológicamente activas, moléculas de ácido nucleico, vectores y células de la invención.

Las proteínas plasmáticas comunes tales como albúmina sérica humana (HSA) e inmunoglobulinas (Ig), incluyendo anticuerpos humanizados, muestran largas vidas medias, normalmente de 2 a 3 semanas, lo que puede atribuirse a su interacción específica con el receptor Fc neonatal (FcRn), lo que conduce a reciclaje endosómico (Ghetie (2002) Immunol Res 25:97-113). En cambio, la mayoría de las demás proteínas de interés farmacéutico, en particular fragmentos de anticuerpos recombinantes, hormonas, interferones, etc. experimentan un rápido aclaramiento (en sangre). Esto es particularmente cierto para proteínas cuyo tamaño es inferior al valor umbral para la filtración renal de aproximadamente 70 kDa (Caliceti (2003) Adv Drug Deliv Rev 55:1261-1277). En estos casos, la vida media plasmática de una proteína farmacéutica sin modificar puede ser considerablemente menor que una hora, haciéndola así esencialmente inútil para la mayoría de aplicaciones terapéuticas. Con el fin de lograr una acción farmacológica sostenida y también un cumplimiento mejorado del paciente, extendiéndose los intervalos de dosificación requeridos hasta varios días o incluso semanas, se establecieron previamente varias estrategias para los fines de desarrollo de fármacos biofarmacéuticos.

En primer lugar, se ha empleado el mecanismo de reciclaje de las proteínas plasmáticas naturales produciendo proteínas de fusión con la parte Fc de Ig, por ejemplo, Enbrel®, un híbrido entre el dominio extracelular del receptor de TNF $\alpha$  e IgG1 humana (Goldenberg (1999) Clin Ther 21:75-87) o con albúmina sérica, por ejemplo, Albuferon®, una fusión correspondiente de IFN $\alpha$  con HSA (Osborn (2002) J Pharmacol Exp Ther 303:540-548). También se ha utilizado albúmina con su alta concentración plasmática de 600  $\mu$ M de manera indirecta, sirviendo como vehículo portador para productos biofarmacéuticos que están dotados de una función de unión a albúmina, por ejemplo, mediante fusión con un dominio de unión a albúmina (ABD, *albumin-binding domain*) bacteriano de proteína G estreptocócica (Makrides (1996) J Pharmacol Exp Ther 277:534-542) o con un péptido seleccionado contra HSA de una biblioteca de presentación en fago (Dennis (2002) J Biol Chem 277:35035-35043; Nguyen (2006) Protein Eng Des Sel 19:291-297).

En segundo lugar, un metodología fundamentalmente diferente para prolongar la vida media plasmática de productos biofarmacéuticos es la conjugación con polímeros químicos altamente solvatados y fisiológicamente inertes, ampliando de ese modo de manera eficaz el radio hidrodinámico de la proteína terapéutica más allá del tamaño de poro glomerular de aproximadamente 3-5 nm (Caliceti (2003) *loc. cit.*). El acoplamiento covalente en condiciones suaves desde el punto de vista bioquímico con derivados activados de polietilenglicol (PEG), o bien aleatoriamente mediante cadenas laterales de Lys (Clark (1996) J Biol Chem 271:21969-21977) o bien por medio de residuos de Cys introducidos específicamente (Rosendahl (2005) BioProcess International 3:52-60) ha sido moderadamente satisfactorio y está aplicándose actualmente en varios fármacos aprobados. Se han logrado ventajas correspondientes especialmente junto con pequeñas proteínas que tienen una actividad farmacológica específica, por ejemplo, Pegasys®, un IFN- $\alpha$ -2a químicamente pegilado recombinante (Harris (2003) Nat Rev Drug Discov 2:214-221; Walsh (2003) Nat Biotechnol 21:865-870).

Sin embargo, el acoplamiento químico de una proteína biológicamente activa con polímeros sintéticos puede tener desventajas con respecto a la producción y el desarrollo biofarmacéuticos. Los derivados de PEG adecuados son caros, especialmente ya que es necesaria una alta pureza, y su conjugación con una proteína recombinante requiere etapas adicionales de procesamiento y purificación *in vitro*, que disminuyen el rendimiento y elevan los costes de fabricación. De hecho, PEG está contaminado a menudo con aldehídos y peróxidos (Ray (1985) Anal Biochem 146:307-312) y es propenso intrínsecamente a la degradación química con el almacenamiento en presencia de oxígeno. Además, la función farmacéutica de una proteína terapéutica puede dificultarse si se modifican cadenas laterales de aminoácidos en las proximidades de su sitio activo bioquímico por el proceso de pegilación. Además, el acoplamiento químico con polímeros sintéticos da como resultado habitualmente una mezcla heterogénea de moléculas que pueden mostrar una varianza sustancial de la actividad *in vivo*.

En tercer lugar, se ha propuesto el uso de análogos de glicosilación de proteínas biológicamente activas en las que se introducen nuevas secuencias consenso de glicosilación de unión a N para prolongar la vida media sérica; véanse el documento WO 02/02597; Perlman (2003) J Clin Endocrinol Metab 88:2327-2335; o Elliott (2003) Nat

Biotechnol 21:414-420. Sin embargo, las proteínas glicosiladas mediante ingeniería genética descritas presentaban una actividad *in vivo* alterada, lo que indica que las nuevas cadenas laterales de hidrato de carbono influyen en la actividad biológica de la proteína modificada por ingeniería genética. Además, es probable que las cadenas laterales de hidrato de carbono adicionales aumenten la antigenicidad de moléculas activas biológicas resultantes, lo que plantea problemas de seguridad sustanciales.

Además, se ha notificado que proteínas de fusión que comprenden la secuencia de repetición artificial derivada de *Trypanosoma cruzi* PSTAD inducen una vida media plasmática prolongada de trans-sialidasa (Alvarez (2004) J Biol Chem 279:3375-3381). Sin embargo, se ha notificado que tales repeticiones derivadas de *Trypanosoma cruzi* inducen una respuesta inmunitaria humoral (Alvarez (2004) *loc. cit.*). Por consiguiente, se desean medios alternativos para prolongar la acción de proteínas biológicamente activas.

El problema técnico subyacente a la presente invención es la provisión de proteínas biológicamente activas con una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro*. La solución al problema técnico anterior se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, esta invención se refiere a una proteína biológicamente activa que comprende al menos dos dominios en la que

- (a) un primer dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica; y
- (b) un segundo dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido que forma una conformación de espiral al azar tal como se determina mediante medición de espectroscopía de dicroísmo circular (DC),

mediante lo cual dicha conformación de espiral al azar media una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa.

Según esta invención, dicho segundo dominio que forma/que adopta una conformación de espiral al azar puede mediar una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa. Dicho segundo dominio, por tanto, conduce a una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de una proteína dada (o un fragmento de la misma) que tiene una/o que media una actividad biológica dada, tal como se define a continuación en el presente documento.

Tal como se documenta a continuación en el presente documento y en los ejemplos adjuntos, se descubrió sorprendentemente que las proteínas biológicamente activas administradas por vía intravenosa que se modifican para comprender un dominio/parte de espiral al azar presentan una vida media plasmática prolongada inesperada en comparación con las proteínas biológicamente activas sin modificar, es decir, que carecen de dicho dominio de espiral al azar.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "espiral al azar" se refiere a cualquier conformación de una molécula polimérica, incluyendo polímeros de aminoácidos, en los que los elementos monoméricos individuales que forman dicha estructura polimérica están orientados de manera esencialmente al azar hacia los elementos monoméricos adyacentes mientras que están unidos químicamente todavía a dichos elementos monoméricos adyacentes. En particular, un polipéptido o polímero de aminoácidos que adopta/que tiene/que forma una "conformación de espiral al azar" carece sustancialmente de una estructura secundaria y terciaria definidas. La naturaleza de las espirales al azar de polipéptido y sus métodos de identificación experimental los conoce el experto en la técnica y se han descrito en la bibliografía científica (Cantor (1980) Biophysical Chemistry, 2ª ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York; Creighton (1993) Proteins - Structures and Molecular Properties, 2ª ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York; Smith (1996) Fold Des 1:R95-R106).

Las proteínas biológicamente activas de la presente invención comprenden un dominio (definido anteriormente en el presente documento como dicho "segundo dominio" de la proteína biológicamente activa de la invención) que adopta/forma una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. La expresión "condiciones fisiológicas" se conoce en la técnica y se refiere a aquellas condiciones en las que las proteínas adoptan habitualmente su conformación nativa. Más específicamente, la expresión "condiciones fisiológicas" se refiere a los parámetros biofísicos según son válidos normalmente para formas de vida superiores y, particularmente, en mamíferos, lo más preferiblemente seres humanos. La expresión "condiciones fisiológicas" puede referirse a los parámetros bioquímicos y biofísicos tal como se encuentran normalmente en el organismo (en particular, en líquidos corporales) de mamíferos y en particular en seres humanos. Dichas "condiciones fisiológicas" pueden referirse a los parámetros correspondientes que se encuentran en el organismo sano así como los parámetros que se encuentran en mamíferos o pacientes humanos enfermos. Por ejemplo, un mamífero o paciente humano enfermo puede tener una condición de temperatura superior, aunque "fisiológica" cuando dicho mamífero o dicho ser humano presenta fiebre. Con respecto a "condiciones fisiológicas" en las que las proteínas adoptan su conformación/estado nativo, los parámetros más importantes son la temperatura (37°C para el cuerpo humano), pH (7,35 – 7,45 para la sangre humana), osmolaridad (280 - 300 mmol/kg H<sub>2</sub>O), y, si es necesario, el contenido en proteína (66 - 85 g/l de suero).

Sin embargo, el experto en la técnica es consciente de que en condiciones fisiológicas estos parámetros pueden variar, por ejemplo, la temperatura, el pH, la osmolaridad y el contenido en proteína pueden ser diferentes en un organismo dado o en líquidos tisulares tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y linfa (Klinke (2005) *Physiologie*, 5ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart). En el líquido cefalorraquídeo, por ejemplo, la osmolaridad puede ser de aproximadamente 290 mmol/kg H<sub>2</sub>O y la concentración de proteína puede ser de entre 0,15 g/l y 0,45 g/l. En la linfa, el pH puede ser de aproximadamente 7,4 y el contenido en proteína puede ser de entre 3 g/l y 5 g/l.

Cuando se determina si un polímero/secuencia de aminoácidos forma/adopta una conformación de espiral al azar en condiciones experimentales usando los métodos tal como se describen a continuación en el presente documento, los parámetros biofísicos tales como temperatura, pH, osmolaridad y contenido en proteína pueden ser diferentes a las condiciones fisiológicas que se encuentran normalmente *in vivo*. Temperaturas de entre 1°C y 42°C o preferiblemente de 4°C a 25°C puede considerarse útiles para someter a prueba y/o verificar las propiedades biofísicas y la actividad biológica de una proteína en condiciones fisiológicas *in vitro*.

Varios tampones, en particular en entornos experimentales (por ejemplo en la determinación de estructuras de proteínas, en particular en mediciones de dicroísmo circular (DC) y otros métodos que permiten al experto en la técnica determinar las propiedades estructurales de un tramo de proteína/aminoácidos) o en tampones, disolventes y/o excipientes para composiciones farmacéuticas, se considera que representan "soluciones fisiológicas"/"condiciones fisiológicas" *in vitro*. Ejemplos de tales tampones son, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS: NaCl 115 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM pH 7,4), tampones Tris, tampones acetato, tampones citrato o tampones similares tales como los usados en los ejemplos adjuntos. Generalmente, el pH de un tampón que representa "condiciones de solución fisiológica" deben encontrarse en un intervalo de desde 6,5 hasta 8,5, preferiblemente en un intervalo de desde 7,0 hasta 8,0, lo más preferiblemente en un intervalo de desde 7,2 hasta 7,7 y la osmolaridad debe encontrarse en un intervalo de desde 10 hasta 1000 mmol/kg H<sub>2</sub>O, más preferiblemente en un intervalo de desde 50 hasta 500 mmol/kg H<sub>2</sub>O y lo más preferiblemente en un intervalo de desde 200 hasta 350 mmol/kg H<sub>2</sub>O. Opcionalmente, el contenido en proteína de un tampón que representa condiciones de solución fisiológica puede encontrarse en un intervalo de desde 0 hasta 100 g/l, omitiendo la propia proteína con actividad biológica, mediante lo cual pueden usarse proteínas de estabilización típicas, por ejemplo, albúmina sérica bovina o humana.

Por consiguiente, también se prevé en el contexto de esta invención que la conformación de espiral al azar comprendida en el "segundo dominio" definido anteriormente de la proteína biológicamente activa de la invención se mantiene en composiciones farmacéuticas, como productos farmacéuticos líquidos. Preferiblemente, han de usarse "condiciones fisiológicas" en sistemas tampón, disolventes y/o excipientes correspondientes. Sin embargo, por ejemplo, en composiciones liofilizadas o secadas (como, por ejemplo, composiciones farmacéuticas), se prevé que la conformación de espiral al azar comprendida en el "segundo dominio" de la proteína biológicamente activa de la invención transitoriamente no está presente y/o no puede detectarse. Sin embargo, dicho "segundo dominio", según los presentes constructos de proteína de la invención, adoptarán/formarán de nuevo su espiral al azar tras la reconstitución en tampones/disoluciones/excipientes/disolventes. Éste es el caso, por ejemplo, en el que se habían liofilizado o secado los constructos de proteína de la invención (por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica). Tras la reconstitución de un constructo de proteína liofilizado/secado de este tipo de la invención que comprende el "primer" y "segundo" dominios tal como se define en el presente documento, la parte/dominio de espiral al azar está presente de nuevo y puede administrarse el constructo de la invención correspondiente, por ejemplo, a un mamífero o paciente humano que necesita intervención médica.

Tal como se mencionó anteriormente, las proteínas biológicamente activas de la presente invención comprenden un dominio (definido anteriormente en el presente documento como dicho "segundo dominio" de la proteína biológicamente activa de la invención) que adopta/forma una conformación de espiral al azar a/en condiciones fisiológicas.

A diferencia de las proteínas biológicamente activas de esta invención, las proteínas desnaturalizadas son proteínas que pierden su conformación funcional y pueden adoptar parcialmente una conformación de espiral al azar como resultado de dicha desnaturalización. Las proteínas pueden desnaturalizarse a través de diversos medios incluyendo la exposición a temperatura, pH y/o concentración salina no fisiológicos o la exposición a agentes desnaturalizantes como urea/cloruro de guanidinio y detergentes. Por consiguiente, ha de evitarse la presencia de compuestos que se sabe que tienen un efecto desnaturalizante sobre las proteínas, tales como urea, cloruro de guanidinio o dodecilsulfato de sodio, cuando se estudia una proteína en condiciones fisiológicas. La urea puede tolerarse hasta concentraciones de 10 mmol/l o incluso 300 mmol/l cuando se investiga una proteína para su aplicación en condiciones fisiológicas en sangre u orina humana, respectivamente.

A diferencia de los polipéptidos desnaturalizados, la secuencia de aminoácidos del dominio de espiral al azar (dicho "segundo dominio") comprendido en el constructo de proteína de la invención adopta/tiene de forma nativa una conformación de espiral al azar, en particular *in vivo* y cuando se administra a mamíferos o pacientes humanos que necesitan intervención médica. Por consiguiente, también se prevé que el constructo de proteína de la presente invención (que comprende el "primer" y "segundo dominio" definidos anteriormente) puede comprender el "segundo",

dominio que forma/que adopta una espiral al azar en forma de los tramos de alanina, serina y prolina identificados en el presente documento (u otros tramos de aminoácidos que forman/tienen/adoptan una espiral al azar en condiciones fisiológicas), pero puede no estar (por ejemplo, en forma de una composición específica, como un liofilizado o composición secada) transitoria o temporalmente en forma de espiral al azar. Sin embargo, es importante que un “segundo dominio” del constructo de proteína de la invención adopte de nuevo tras, por ejemplo, su reconstitución en tampones correspondientes (preferiblemente tampones/excipientes y/o disolventes “fisiológicos”), la espiral al azar definida en el presente documento. Dicho “segundo dominio” puede, (tras una reconstitución correspondiente) mediar una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de la proteína biológicamente activa de la invención. La proteína biológicamente activa de esta invención tiene una vida media y estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* más larga en comparación con la misma “proteína de interés”/“primer dominio” que no comprende el “segundo dominio” adicional tal como se define en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio” se refiere a cualquier región/parte de una secuencia de aminoácidos que puede adoptar de manera autónoma una estructura y/o función específicas. En el contexto de la presente invención, por consiguiente, un “dominio” puede representar un dominio funcional o un dominio estructural. Tal como se describe en el presente documento, las proteínas de la presente invención comprenden al menos un dominio/parte que tiene y/o que media una actividad biológica y al menos un dominio/parte que forma una conformación de espiral al azar. Sin embargo, las proteínas de la invención también pueden consistir en más de dos dominios y pueden comprender, por ejemplo, una estructura de conector adicional entre los dos dominios/partes definidos en el presente documento u otro dominio/parte como, por ejemplo, un sitio de escisión sensible a proteasas, una cola de afinidad tal como la cola de His6 o *Strep*-tag, un péptido señal, péptido de retención, un péptido de direccionamiento como un péptido de translocación de membrana o dominios efectores adicionales como fragmentos de anticuerpo para el direccionamiento a tumores asociado con una toxina antitumoral o una enzima para la activación de fármacos, etc.

Se conocen en la técnica métodos para determinar si un polímero de aminoácidos forma/adopta una conformación de espiral al azar (Cantor (1980) *loc. cit.*; Creighton (1993) *loc. cit.*; Smith (1996) *loc. cit.*). Tales métodos incluyen la espectroscopía de dicroísmo circular (DC) tal como se pone como ejemplo a continuación en el presente documento. La espectroscopía DC representa un método de espectroscopía de absorción de luz en el que se mide la diferencia en absorbancia de luz polarizada de manera circular a la izquierda y a la derecha por una sustancia. La estructura secundaria de una proteína puede determinarse mediante espectroscopía DC usando espectros de ultravioleta lejano con una longitud de onda de entre aproximadamente 190 y 250 nm. A estas longitudes de onda, pueden analizarse las estructuras secundarias diferentes que se encuentran comúnmente en polipéptidos, puesto que las conformaciones de hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$  paralela y antiparalela y espiral al azar dan lugar cada una de ellas a una forma y magnitud características del espectro DC. Por consiguiente, usando espectrometría DC el experto puede determinar fácilmente si un polímero de aminoácidos forma/adopta una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Otros métodos biofísicos establecidos incluyen espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de absorción, espectroscopía de infrarrojos y Raman, medición del volumen hidrodinámico mediante cromatografía de exclusión molecular, ultracentrifugación analítica o dispersión de luz dinámica/estática así como mediciones del coeficiente de fricción o la viscosidad intrínseca (Cantor (1980) *loc. cit.*; Creighton (1993) *loc. cit.*; Smith (1996) *loc. cit.*).

En otra realización, la proteína biológicamente activa de la invención tiene un volumen hidrodinámico tal como se determina mediante filtración en gel analítica (también conocida como cromatografía de exclusión molecular, SEC) de al menos 70 kDa), de preferiblemente al menos 80 kDa, más preferiblemente de al menos 90 kDa, incluso más preferiblemente de al menos 100 kDa, particularmente de preferiblemente al menos 125 kDa) y lo más preferiblemente de al menos 150 kDa. El experto en la técnica puede determinar fácilmente el volumen hidrodinámico de proteínas específicas. Tales métodos pueden incluir dispersión de luz dinámica/estática, ultracentrifugación analítica o filtración en gel analítica tal como se pone como ejemplo a continuación en el presente documento. La filtración en gel analítica representa un método conocido en la técnica para medir el volumen hidrodinámico de macromoléculas. Alternativamente, puede estimarse el volumen hidrodinámico de un polipéptido globular mediante su peso molecular. Tal como se describe a continuación en el presente documento, sin embargo, el volumen hidrodinámico de las proteínas de la invención que comprenden el segundo dominio definido anteriormente, es decir, el dominio que comprende al menos 100 residuos de aminoácido y que tiene una conformación de espiral al azar, se muestra que tienen un volumen hidrodinámico inesperadamente alto en relación con el volumen hidrodinámico estimado para una proteína globular plegada correspondiente basado en su peso molecular.

Además de lo anterior, se han descrito métodos teóricos para la predicción de estructuras secundarias en proteínas. Un ejemplo de un método teórico de este tipo es el método de Chou-Fasman (Chou y Fasman (1974) *Biochemistry* 13:222-245) que se basa en un análisis de las frecuencias relativas de cada aminoácido en hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  y giros basados en estructuras de proteínas conocidas resueltas con cristalografía de rayos X. Sin embargo, la predicción teórica de la estructura secundaria de proteínas se sabe que es poco fiable. Tal como se pone como ejemplo a continuación en el presente documento, se encontró que secuencias de aminoácidos que se esperaban que adoptasen una estructura secundaria de hélice  $\alpha$  según el método de Chou-Fasman formaban una espiral al azar. Por consiguiente, los métodos teóricos tales como el algoritmo de Chou-Fasman sólo tienen un valor predictivo

muy limitado si un polímero de aminoácidos dado adopta una conformación de espiral al azar.

En una realización, la secuencia de aminoácidos que adopta/que tiene/que forma una conformación de espiral al azar consiste en al menos 350 residuos de aminoácido y lo más preferiblemente en al menos 400 residuos de aminoácido. En otra realización, la secuencia de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar consiste como máximo en 1000 residuos de aminoácido, preferiblemente como máximo en 900 residuos de aminoácido, más preferiblemente como máximo en 800 residuos de aminoácido, incluso más preferiblemente como máximo en 700 residuos de aminoácido, de manera particularmente preferible como máximo en 600 residuos de aminoácido. Por tanto, la secuencia de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede consistir como máximo en 500 residuos de aminoácido o como máximo en 450 residuos de aminoácido. También se prevé en el presente documento que la secuencia de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede consistir como máximo en 1200, 1500 y hasta 3000 residuos de aminoácido. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede consistir en de 350 a 3000 residuos de aminoácido. En realizaciones particulares, dicha secuencia de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar consiste en de 350 a 1000 residuos de aminoácido tal como se caracteriza en el presente documento, es decir, que comprende alanina, serina y prolina como residuos principales o únicos tal como se define a continuación. Lo esencial de la presente invención es, por consiguiente, la provisión de polímeros de aminoácidos que forman una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas y consisten principalmente en estos tres residuos de aminoácido, mediante lo cual los residuos de prolina representan preferiblemente de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 40 % del dominio que forma la espiral al azar. Los residuos de alanina y serina comprenden el resto de al menos el 60 % al 96 % de dicho dominio que forma la espiral al azar. Sin embargo, tal como se detallará a continuación en el presente documento dicho dominio que forma la espiral al azar también puede comprender aminoácidos adicionales que difieren de alanina, serina y prolina, es decir, como constituyentes minoritarios.

La expresión "al menos 100/150/200/250/300/300/350 (etc.) residuos de aminoácido" no se limita al número conciso de residuos de aminoácido sino que comprende también tramos de aminoácidos que comprenden de un 10 % a un 20 % adicional o comprenden de un 10 % a un 20 % menos de residuos. Por ejemplo, "al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido" también puede comprender de 80 a 100 y aproximadamente de 100 a 120 residuos de aminoácido sin diferir de lo esencial de la presente invención. Preferiblemente, el "segundo dominio" de la(s) proteína(s)/el/los polipéptido(s) biológicamente activo(s) de la invención comprende una longitud máxima de aproximadamente 1000 residuos de aminoácido. Sin embargo, también se prevén "segundos dominios" más largos en el contexto de la presente invención, es decir, "segundos dominios" que proporcionan la conformación de espiral al azar deseada en condiciones fisiológicas y que comprenden hasta aproximadamente 3000 residuos de aminoácido. De nuevo, el término "aproximadamente" en este contexto no se limita o restringe a la cantidad concisa de residuos de aminoácido sino que puede comprender también +/- aproximadamente el 10 % o +/- aproximadamente el 20 % sin diferir de esta invención.

En el contexto de esta invención, se descubrió sorprendentemente que polímeros de aminoácidos que consisten principalmente en residuos de alanina y serina o, en una realización preferida que consisten principal o únicamente en residuos de alanina, serina y prolina, forman una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la presente invención proporciona módulos/unidades de secuencia/repeticiones poliméricas/casetes poliméricos/elementos estructurales que consisten en alanina, serina y prolina que pueden usarse como (una) parte(s) del "segundo dominio" definido en el presente documento de una proteína/polipéptido biológicamente activo. Sin embargo, el experto es consciente de que un polímero de aminoácidos también puede formar una conformación de espiral al azar cuando están comprendidos otros residuos distintos de alanina, serina y prolina como constituyente minoritario en dicho "segundo dominio". La expresión "constituyente minoritario" tal como se usa en el presente documento significa que como máximo el 10 %, es decir, como máximo 10 de 100 aminoácidos pueden ser diferentes de alanina, serina y prolina, preferiblemente como máximo el 8 %, es decir, como máximo 8 de 100 aminoácidos pueden ser diferentes de alanina, serina y prolina, más preferiblemente como máximo el 6 %, es decir, como máximo 6 de 100 aminoácidos pueden ser diferentes de alanina, serina y prolina, incluso más preferiblemente como máximo el 5 %, es decir, como máximo 5 de 100 aminoácidos pueden ser diferentes de alanina, serina y prolina, de manera particularmente preferible como máximo el 4 %, es decir, como máximo 4 de 100 aminoácidos pueden ser diferentes de alanina, serina y prolina, particularmente más preferiblemente como máximo el 3 %, es decir, como máximo 3 de 100 aminoácidos pueden ser diferentes de alanina, serina y prolina, incluso particularmente más preferiblemente como máximo el 2 %, es decir, como máximo 2 de 100 aminoácidos pueden ser diferentes de alanina, serina y prolina y lo más preferiblemente como máximo el 1 %, es decir, como máximo 1 de 100 de los aminoácidos que codifica para el dominio que forma la espiral al azar puede ser diferentes de alanina, serina y prolina. Dichos aminoácidos diferentes de alanina, serina y prolina pueden seleccionarse del grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr y Val.

Se encontró sorprendentemente que los polímeros de aminoácidos tal como se dan a conocer en el presente documento y que consisten en alanina, serina y prolina según la invención adoptan una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Por tanto, son moléculas ventajosas para proporcionar el "segundo dominio" definido en el presente documento de la(s) proteína(s)/el/los polipéptido(s) biológicamente activo(s) de la invención, es decir, un tramo de polipéptido que forma en condiciones fisiológicas una conformación de espiral al azar y media de ese modo una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* para proteína(s) o polipéptido(s) biológicamente activo(s)

(“funcionales”). El volumen hidrodinámico de una proteína funcional que se fusiona a dicho dominio de espiral al azar aumenta de manera espectacular tal como puede estimarse usando métodos convencionales mencionados en el presente documento y también ilustrados en los ejemplos adjuntos. Puesto que no se cree que el dominio de espiral al azar adopte una estructura o función estable por sí mismo, se conserva esencialmente la actividad biológica mediada por la proteína funcional de interés a la que se fusiona. Además, se cree que los polímeros de aminoácidos que forman un dominio de espiral al azar tal como se dan a conocer en el presente documento son biológicamente inertes, especialmente con respecto a la proteólisis en el plasma sanguíneo, inmunogenicidad, punto isoeléctrico/comportamiento electrostático, unión a receptores de la superficie celular así como internalización, pero todavía biodegradables, lo que proporciona claras ventajas con respecto a polímeros sintéticos tales como PEG.

En otra realización, los polímeros de aminoácidos que adoptan una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas comprenden una pluralidad de “repeticiones de aminoácidos”/“casetes de aminoácidos”/“repeticiones de casetes”, en los que dichas “repeticiones de aminoácidos”/“casetes de aminoácidos”/“repeticiones de casetes” consisten en residuos de Ala, Ser y Pro (representados en el presente documento como “PAS”, o como “APS”) y en los que no más de 6 residuos de aminoácido consecutivos son idénticos y en los que dichos residuos de prolina constituyen más del 4 % y menos del 40 % de los aminoácidos de dicho segundo dominio que forma una espiral al azar. Los polímeros de aminoácidos que adoptan una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas pueden comprender una pluralidad de repeticiones de aminoácidos/repeticiones de casetes idénticos o una pluralidad de repeticiones de aminoácidos no idénticos. Se proporcionan ejemplos no limitativos de “repeticiones de aminoácidos”, “elementos estructurales”, “módulos”, “repeticiones”, “casetes de aminoácidos” etc. que consisten en residuos de Ala, Ser y Pro a continuación en el presente documento; véanse las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28 o fragmentos o multímeros de estas secuencias. Un “fragmento” comprende al menos 3 aminoácidos y comprende al menos una alanina, una serina y/o una prolina.

La repetición de aminoácidos según la presente descripción puede consistir en al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más residuos de aminoácido, en la que cada repetición comprende (un) residuo(s) de Ala, Ser y Pro. En una realización, la repetición de aminoácidos según la presente invención no comprende más de 100 residuos de aminoácido. Preferiblemente, la repetición de aminoácidos/repetición de casetes tal como se define en el presente documento comprende más de aproximadamente el 4 %, preferiblemente más de aproximadamente el 5 %, incluso más preferiblemente más de aproximadamente el 6 %, de manera particularmente preferible más de aproximadamente el 8 %, particularmente más preferiblemente más de aproximadamente el 10 %, incluso particularmente más preferiblemente más de aproximadamente el 15 % y lo más preferiblemente más de aproximadamente el 20 % de residuos de prolina. Una repetición de aminoácidos/repetición de casetes de este tipo tal como se define en el presente documento comprende preferiblemente menos de aproximadamente el 40 % o menos de aproximadamente el 35 % de residuos de prolina; véase también los constructos de PAS proporcionados a continuación en el presente documento.

Aún en otra realización, los polímeros de aminoácidos que forman una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas tienen la fórmula (I):



en la que dicho polímero de aminoácidos según la fórmula (I) comprende además residuos de prolina tal como se definen en el presente documento y en la que x se selecciona independientemente de un número entero de 0 a 6. Además, para cada n, y se selecciona independientemente de un número entero de 1 a 6 y cada z se selecciona independientemente de un número entero de 1 a 6. n, finalmente, es cualquier número entero de modo que dicho segundo dominio consiste en al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido, y en particular en al menos aproximadamente de 100 a aproximadamente 3000 residuos de aminoácido, preferiblemente en aproximadamente 2000 y más preferiblemente en aproximadamente 1000 residuos de aminoácido.

En realizaciones preferidas, el polímero de aminoácidos que comprende las “repeticiones de aminoácidos”/“casetes de aminoácidos”/“repeticiones de casetes” definidos anteriormente que forman una conformación de espiral al azar comprende no más de 5 residuos de aminoácido consecutivos idénticos, más preferiblemente no más de 4 residuos de aminoácido consecutivos idénticos y lo más preferiblemente no más de 3 residuos de aminoácido consecutivos idénticos.

Tal como se indicó ya anteriormente en el presente documento, el polímero de aminoácidos de la invención que forma una conformación de espiral al azar comprende residuos de prolina, en el que dichos residuos de prolina constituyen más de aproximadamente el 4 %, preferiblemente más de aproximadamente el 5 %, incluso más preferiblemente más de aproximadamente el 6 %, de manera particularmente preferible más de aproximadamente el 8 %, particularmente más preferiblemente más de aproximadamente el 10 %, incluso particularmente más preferiblemente más de aproximadamente el 15 % y lo más preferiblemente más de aproximadamente el 20 % de los aminoácidos que constituyen el dominio que forma la espiral al azar. Un polímero de aminoácidos de la invención que forma una conformación de espiral al azar de este tipo comprende preferiblemente menos de aproximadamente el 40 %, o menos de aproximadamente el 35 % de los aminoácidos que constituyen el dominio que forma la espiral al azar. Tal como se muestra en el ejemplo 13 adjunto, el polímero PAS#1P2 con su menor proporción de residuos

de Pro muestra un mínimo menos pronunciado aproximadamente a 200 nm en su espectro DC, lo que indica una dependencia del carácter de espiral al azar de los polímeros de aminoácidos según esta invención con el contenido de residuos de prolina.

5 En otra realización preferida, el polímero de aminoácidos que comprende las “repeticiones de aminoácidos”/“casetes de aminoácidos”/“repeticiones de casetes” definidos anteriormente que forman una conformación de espiral al azar comprende más de aproximadamente el 4 % pero menos de aproximadamente el 50 %, preferiblemente más de aproximadamente el 10 % pero menos de aproximadamente el 50 % y lo más preferiblemente más de aproximadamente el 20 % pero menos de aproximadamente el 50 % de residuos de alanina de los aminoácidos que constituyen el dominio que forma la espiral al azar.

10 En una realización preferida adicional, el polímero de aminoácidos que forma y que comprende la conformación de espiral al azar de las “repeticiones de aminoácidos”/“casetes de aminoácidos”/“repeticiones de casetes” definidos anteriormente comprende más de aproximadamente el 4 % y menos de aproximadamente el 50 %, preferiblemente más de aproximadamente el 10 % pero menos de aproximadamente el 50 % y lo más preferiblemente más de aproximadamente el 20 % pero menos de aproximadamente el 50 % de residuos de serina de los aminoácidos que constituyen el dominio que forma la espiral al azar.

15 Por consiguiente, el polímero de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede comprender aproximadamente el 35 % de residuos de prolina, aproximadamente el 50 % de residuos de alanina y aproximadamente el 15 % de residuos de serina de los aminoácidos que constituyen el dominio que forma la espiral al azar. Alternativamente, el polímero de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede comprender aproximadamente el 35 % de residuos de prolina, aproximadamente el 15 % de residuos de alanina y aproximadamente el 50 % de residuos de serina de los aminoácidos que constituyen el dominio que forma la espiral al azar. El término “aproximadamente” tal como se usó anteriormente en el presente documento también se refiere al valor preciso del porcentaje dado.

25 Se describe adicionalmente en el presente documento polímeros de aminoácidos que comprenden la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AAAASSASSASSSSSAAASA (piSA; SEQ ID NO: 2) AASAAASSAAASAAASASS (SEQ ID NO: 4), ASASASASASSASSAAASA (SEQ ID NO: 6), SAASSASSSSAASSASAAA (SEQ ID NO: 8), SSSAASAASAAAASSSAS (SEQ ID NO: 10), SSASSAASSASSSSASAA (SEQ ID NO: 12), SASASASASAAASSASSAS (SEQ ID NO: 14) y ASSAAASAAASSAASASSS (SEQ ID NO: 16). Los multímeros de los módulos/unidades de secuencia de alanina-serina descritos pueden formar una conformación de espiral al azar en el caso de que la secuencia de aminoácidos resultante comprende además residuos de prolina tal como se definió anteriormente en el presente documento. Estos módulos/unidades de secuencia puestos como ejemplo pueden estar codificados por moléculas de ácido nucleico que comprenden las siguientes secuencias

GCCGCTGCTGCATCCTCTGCAAGCTCCGCTTCTTCCTCTAGCTCCGCAGCTGCATC  
 TGCT (SEQ ID NO: 1),  
 GCTGCTTCCGCTGCTGCTTCCCTCCGCTGCTGCTTCCGCTGCTGCTGCTTCCGCTTCC  
 TCC (SEQ ID NO: 3),  
 GCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCCTCCGCTGCTTCCGCTGCTTCC  
 GCT (SEQ ID NO: 5),  
 TCCGCTGCTTCCCTCCGCTTCCCTCCCTCCGCTGCTTCCCTCCGCTTCCGCTGCT  
 GCT (SEQ ID NO: 7),  
 TCCTCCTCCGCTGCTTCCGCTGCTTCCGCTGCTGCTGCTGCTTCCCTCCCTCCGCT  
 TCC (SEQ ID NO: 9),  
 TCCTCCGCTTCCCTCCGCTGCTTCCCTCCGCTTCCCTCCCTCCGCTTCCGCT  
 GCT (SEQ ID NO: 11),  
 TCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTGCTTCCCTCCGCTTCCCTCCGCT  
 TCC (SEQ ID NO: 13) y  
 GCTTCCCTCCGCTGCTGCTTCCGCTGCTGCTTCCCTCCGCTGCTTCCGCTTCCCTCC  
 TCC (SEQ ID NO: 15).

35 En una realización preferida, el polímero de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar comprende

la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (PAS#1; SEQ ID NO: 18), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (PAS#2; SEQ ID NO: 20), SAPSSPSPSAPSSPSPASPS (PAS#3 modificada; SEQ ID NO: 22 modificada), APSSPSPSAPSSPSPASPS (PAS#3, SEQ ID NO: 22, no modificada). En una alternativa, una PAS#3 ligeramente modificada, aunque activa puede tener la secuencia citada anteriormente

5 SAPSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 63). Esta secuencia corresponde a la SEQ ID NO: 22 proporcionada en el presente documento en una forma permutada de manera circular, en la que se eliminó la última serina y se adjuntó otra serina como aminoácido inicial. Como consecuencia, los multímeros de esta secuencia modificada según la invención tiene esencialmente la misma unidad de repetición interna que los multímeros de la secuencia no modificada, excepto por el primer y el último residuo. Por consiguiente, esta PAS#3 modificada (SEQ ID NO: 63)

10 puede considerarse como un ejemplo de un "módulo"/elemento estructural" adicional de los polímeros de aminoácidos proporcionados en el presente documento según esta invención. Queda claro para el experto en la técnica que también pueden usarse otros "módulos" y fragmentos (más cortos) o versiones permutadas de manera circular de los polímeros de aminoácidos proporcionados en el presente documento como "módulos", "repeticiones" y/o elementos estructurales para el "segundo dominio" definido en el presente documento de la proteína biológicamente activa proporcionada. Sin embargo, incluso polímeros de aminoácidos adicionales e ilustrativos que forman una conformación de espiral al azar pueden comprender secuencias de aminoácidos que pueden seleccionarse del grupo que consiste en SSPSAPSPSSPASPSSPA (PAS#4; SEQ ID NO: 24), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (PAS#5; SEQ ID NO: 26) y ASAAAPAAASAAASAPSAAA (PAS#1P2; SEQ ID NO: 28). De nuevo, también puede emplearse (un) fragmento(s) o (un) multímero(s) o bien versiones permutadas de manera circular de estas secuencias y las secuencias proporcionadas anteriormente en el presente documento en el contexto de la presente invención como elementos estructurales para el "segundo dominio" definido en el presente documento de la(s) proteína(s)/el/los polipéptido(s) biológicamente activo(s) de la invención. El experto en la técnica se encuentra fácilmente en una posición para generar polímeros de aminoácidos adicionales que forman una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas y están constituidos principalmente por alanina, serina y prolina tal como se define en el presente documento. Ejemplos adicionales y otros de este tipo de polímeros de aminoácidos que forman una conformación de espiral al azar que van a usarse como elementos estructurales o módulos del "segundo dominio" definido en el presente documento de la(s) proteína(s)/el/los polipéptido(s) biológicamente activo(s) de la invención pueden comprender, entre otros combinaciones y/o fragmentos o versiones permutadas de manera circular de los "elementos estructurales", "casetes poliméricos" o "repeticiones poliméricas" específicos mostrados anteriormente. Por consiguiente, los módulos/unidades de secuencia/repeticiones poliméricas/casetes poliméricos puestos como ejemplo del dominio de espiral al azar también pueden proporcionar fragmentos individuales que pueden combinarse nuevamente para formar módulos/unidades de secuencia/repeticiones poliméricas/casetes poliméricos adicionales según esta invención.

35 Las expresiones "módulo(s)", "unidad(es) de secuencia", "repetición/repeticiones polimérica(s)", "casete(s) polimérico(s)" y "elemento(s) estructural(es) se usan como sinónimos en el presente documento y se refieren a tramos de aminoácidos individuales que pueden usarse para formar el "segundo dominio" definido en el presente documento de la proteína/polipéptido biológicamente activo de la invención. Dicho segundo dominio comprende una secuencia de aminoácidos que consiste preferiblemente en al menos 350 residuos de aminoácido y forma una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas.

40 Los módulos/unidades de secuencia/repeticiones poliméricas/casetes poliméricos/elementos estructurales puestos como ejemplo anteriormente del dominio de espiral al azar de las proteínas/polipéptidos biológicamente activos de la invención (es decir, el "segundo dominio" definido en el presente documento de dichas proteínas/polipéptido biológicamente activos) puede estar codificado por moléculas de ácido nucleico que comprenden las siguientes secuencias

GCCTCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCAAGCCCTGCTGCACCAGCTCCGTCTGCTCC  
 TGCT (SEQ ID NO: 17),  
 GCTGCTCCGGCTTCCCCGGCTCCGGCTGCTCCGTCCGCTCCGGCTCCGGCTGCTCC  
 GTCC (SEQ ID NO: 19),  
 GCTCCGTCTCCCCGTCCCCGTCCGGCTCCGTCTCCCCGTCCCCGGCTTCCCCGTC  
 C-TCC (SEQ ID NO: 21),  
 TCCTCCCCGTCCGCTCCGTCCCCGTCTCCCCGGCTTCCCCGTCCCCGTCTCCCC  
 GGCT (SEQ ID NO: 23),  
 GCCGTTCTCCAGCAGCTCCTTCTGCTCCACCAGCAGCTGCAAGCCCTGCTGCACC  
 AAGCGCACCTCCTGCT (SEQ ID NO: 25) y/o  
 GCCTCTGCTGCAGCACCTGCAGCAGCAAGCGCAGCTGCATCTGCTCCATCTGCAG  
 CTGCT (SEQ ID NO: 27).

Una PAS#3 modificada (SEQ ID NO: 22 modificada) tal como se describió anteriormente en el presente documento puede estar codificada por la siguiente secuencia de ácido nucleico:

TCCGCTCCGTCTCCCCGTCCCCGTCCGGCTCCGTCTCCCCGTCCCCGGCTTCCCC  
 GTCC (SED ID NO: 21 modificada).

- 5 Ha de observarse y no es limitativo de la presente invención que, según el conocimiento del experto de que los módulos/unidades de secuencia/repeticiones poliméricas/casetes poliméricos/elementos estructurales descritos y puestos como ejemplo en el presente documento del dominio de espiral al azar (o fragmentos del mismo o multímeros o versiones permutadas de manera circular del mismo) pueden estar codificados por diferentes secuencias de ácido nucleico según el código genético, que es de naturaleza degenerada, es decir, diferentes codones de tripletes de nucleótidos pueden codificar para el mismo residuo de aminoácido. Además, los residuos terminales pueden diferir, dependiendo del diseño de un casete de secuencia de nucleótidos según esta invención y de la estrategia de ligamiento aplicada para obtener multímeros del mismo. Por ejemplo, el "módulo" PAS#1 tal como se muestra en las SEQ ID NO: 18 y 30 puede estar codificado por las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO: 17 y 29, respectivamente. En cambio a la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 30 comprende una alanina adicional en el extremo C-terminal, cuyo codón puede deleccionarse si se ligan casetes de nucleótidos individuales mediante extremos cohesivos tal como se describe en algunos de los ejemplos adjuntos.

Según lo anterior, el polímero de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede comprender un multímero que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos con las SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26 ó 28 tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento o puede comprender un multímero que consiste en más de una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26 y 28. Además, se prevé que se usen también fragmentos o versiones permutadas de manera circular de estas secuencias puestas como ejemplo para construir módulos/unidades de secuencia/repeticiones poliméricas/casetes poliméricos/elementos estructurales adicionales del dominio de espiral al azar ("segundo dominio") de la(s) proteína(s)/el/los polipéptido(s) biológicamente activo(s) de la invención.

- 25 En otra realización, el polímero de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede comprender un multímero que consiste en una permutación (circular) de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 18), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 20), APSSPSPAPSSPASPSS (SEQ ID NO: 22, o como secuencia modificada S-APSSPSPAPSSPASPSS (SEQ ID NO: 63), SSPSPSPASPSSPASPSSPA (SEQ ID NO: 24), AASPAPSPAPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 26) y ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 28) o (un) multímeros(s) de estas secuencias permutadas (circulares).

Aún en otra realización, el polímero de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar puede comprender un multímero que consiste en un fragmento/parte de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 18), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 20), APSSPSPAPSSPASPSS (SEQ ID NO: 22; o como secuencia modificada S-APSSPSPAPSSPASPSS ((SEQ ID NO: 63)), SSPSPSPASPSSPASPSSPA (SEQ ID NO: 24), AASPAPSPAPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 26) y ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 28) o (un) multímeros(s) de estos módulos/unidades de secuencia/repeticiones poliméricas/casetes poliméricos/elementos estructurales puestos como ejemplo. Los "fragmentos" de estas secuencias que van a emplearse según esta invención para la generación del "segundo dominio" de la proteína biológicamente activa de la invención/polipéptido pueden consistir en al menos 3,

preferiblemente en al menos 4, más preferiblemente en al menos 5, incluso más preferiblemente en al menos 6, todavía más preferiblemente en al menos 8, de manera particularmente preferible en al menos 10, de manera particularmente más preferible en al menos 12, incluso de manera particularmente más preferible en al menos 14, preferiblemente en al menos 6, todavía más preferiblemente en al menos 8, de manera particularmente preferible en al menos 10, de manera particularmente más preferible en al menos 12, incluso de manera particularmente más preferible en al menos 14, todavía de manera particularmente más preferible en al menos 16, y lo más preferiblemente en al menos 18 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en dichas SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 26 y 28.

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, los módulos/unidades de secuencia/elementos estructurales proporcionados en el presente documento etc. del dominio de espiral al azar son meramente ejemplos del polímero de aminoácidos de la invención que forma una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Según lo esencial de la presente invención estos "módulos", "unidades de secuencia" y/o "repeticiones" comprenden el contenido/fracción de alanina, serina y prolina identificado anteriormente. Por tanto, está dentro de los conocimientos normales del experto generar tales "módulos", "unidades de secuencia" y/o "repeticiones" adicionales según esta invención. Por ejemplo, pueden combinarse fragmentos individuales de los "módulos", "unidades de secuencia" y/o "repeticiones" de la invención identificados en el presente documento con "módulos", "unidades de secuencia" y/o "repeticiones" individuales adicionales, siempre que se respeten las normas identificadas anteriormente para la cantidad y distribución global de alanina, serina y prolina. De nuevo, estos "módulos", "unidades de secuencia" y/o "repeticiones" también pueden comprender residuos de aminoácido adicionales, sin embargo sólo como constituyentes mínimos o minoritarios (como máximo el 10 %, preferiblemente como máximo el 2 % del "módulo", "unidad de secuencia" y/o "repetición" individual). Dicho "módulo", "unidad de secuencia" y/o "repetición" individual consiste, según esta invención, en al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido. Los "módulos", "unidades de secuencia" y/o "repeticiones" individuales pueden combinarse con el fin de formar polímeros de aminoácidos que forman una espiral al azar más largos, mediante lo cual una longitud máxima del "segundo dominio" definido en el presente documento de una proteína biológicamente activa es de aproximadamente 3000 aminoácidos. Se prefieren en el contexto de esta invención proteínas biológicamente activas que comprenden al menos dos dominios en las que un primer dominio tal como se definió anteriormente en el presente documento de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica; y un segundo dominio de dichos al menos dos dominios tal como se define en el presente documento comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido y una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Dicha conformación de espiral al azar tal como se proporciona en el presente documento y que consiste principalmente en alanina, serina y prolina media una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa. Dicho segundo dominio puede componerse de los "módulos", "unidades de secuencia" y/o "repeticiones" individuales tal como se proporcionan en el presente documento o puede comprender fragmentos o partes de estos "módulos", "secuencias" individuales, ilustrativos y seguir las enseñanzas proporcionadas anteriormente en el presente documento y que se ponen como ejemplo a continuación en el presente documento en la memoria descriptiva y los ejemplos adjuntos. Por ejemplo, la parte experimental adjunta muestra una amplia evidencia de que las proteínas que comprenden un "segundo dominio" definido en el presente documento, adicional que proporciona una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas (por ejemplo, polímeros que consisten en aproximadamente 200 o aproximadamente 400 o aproximadamente 600 residuos de aminoácido y que comprenden PAS#1/SEQ ID NO: 18, PAS#2/SEQ ID NO: 20, PAS#3/SEQ ID NO: 22, PAS#5/SEQ ID NO: 26 y/o PAS#1P2/SEQ ID NO: 28 como "elementos estructurales") tienen una estabilidad en suero o vida media plasmática ventajosa, incluso *in vivo* en comparación con la proteína biológicamente activa no modificada. Como ejemplo no limitativo de la presente invención, se comparó la estabilidad *in vivo* de IFNa2b no modificado con la estabilidad *in vivo* de IFNa2b modificado que comprendía un "segundo dominio" adicional tal como se define en el presente documento, que adopta una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas.

Los homopolímeros de la mayoría de los aminoácidos, en particular los aminoácidos hidrófobos, son habitualmente insolubles en disolución acuosa (Bamford (1956) *Synthetic Polypeptides – Preparation, Structure, and Properties*, 2<sup>a</sup> ed., Academic Press, Nueva York). Se sabe que los homopolímeros de varios aminoácidos hidrófilos forman estructuras secundarias, por ejemplo, hélice  $\alpha$  en el caso de Ala (Shental-Bechor (2005) *Biophys J* 88:2391-2402) y lámina  $\beta$  en el caso de Ser (Quadrioglio (1968) *J Am Chem Soc* 90:2760-2765) mientras que la poli-prolina, el homooligopéptido más rígido (Schimmel (1967) *Proc Natl Acad Sci USA* 58:52-59), forma una trans hélice de tipo II en disolución acuosa (Cowan (1955) *Nature* 176:501-503).

Usando los principios teóricos de la biofísica de polímeros, el diámetro de la espiral al azar de una cadena de 200 residuos de aminoácido ascendería en el caso de poli-glicina, por ejemplo, a aproximadamente 75 Å, calculado como el valor cuadrático medio de la distancia de extremo a extremo promedio de  $\sqrt{\langle r^2 \rangle_0} = l \cdot \sqrt{n \cdot C_\infty}$ , siendo  $n = 200$  enlaces rotativos de longitud  $l = 3,8$  Å para cada distancia  $C_\alpha - C_\alpha$  y la "razón característica"  $C_\infty \approx 2,0$  para poli(Gly) (Brant (1967) *J Mol Biol* 23:47-65; Creighton, (1993) *loc. cit.*). Esta relación muestra que el experto en la técnica esperaría que el volumen hidrodinámico de un polímero de aminoácidos de cadenas al azar pudiera o bien extenderse mediante (a) el uso de una mayor longitud de cadena  $l$  o bien mediante (b) el uso de aminoácidos que

presentan una mayor razón característica,  $C_{\infty}$ .  $C_{\infty}$  es una medida para la rigidez inherente de la cadena al azar molecular y tiene un valor general de 9 para la mayoría de los aminoácidos (Brant (1967) *loc. cit.*). Sólo Gly, que carece de una cadena lateral, y también el iminoácido Pro presentan valores significativamente menores. Por tanto, se espera que Gly y Pro (en condiciones desnaturalizantes) contribuyan a reducir las dimensiones de las proteínas con espiral al azar (Miller (1968) *Biochemistry* 7:3925-3935). Por consiguiente, se espera que los polímeros de aminoácidos que comprenden residuos de prolina, tengan un volumen hidrodinámico relativamente compacto. En cambio a esta enseñanza, sin embargo, se muestra en el presente documento que el volumen hidrodinámico de los polímeros de aminoácidos de la invención que comprenden una mezcla de residuos de alanina, serina y prolina tienen un volumen hidrodinámico disminuido de manera espectacular tal como se determina mediante cromatografía de permeación en gel analítica en comparación con el volumen hidrodinámico esperado. De hecho, es sorprendente que los polipéptidos que comprenden mezclas de estos tres aminoácidos, de los que cada uno solo tiende a formar un homooligopéptido con estructura secundaria definida, adoptan una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Tales polipéptidos de la invención tienen un mayor radio hidrodinámico que los homopolímeros que comprenden el mismo número de residuos de Gly y confieren una mejor solubilidad a la proteína biológicamente activa según la invención.

El documento WO 2006/081249 describe conjugados de proteína que comprenden una proteína biológicamente activa acoplada a un polipéptido que comprende de 2 a 500 unidades de una repetición de aminoácidos que tiene Gly, Asn, y Gln como constituyente mayoritario y Ser, Thr, Asp, Gln, Glu, His, y Asn como constituyente minoritario. Se describe que dichos conjugados de proteína tienen una vida media plasmática o bien aumentada o bien disminuida en comparación con la proteína biológicamente activa no conjugada. El documento WO 2006/081249, sin embargo, no proporciona ninguna enseñanza para predecir si una repetición de aminoácidos específica reduce o aumenta la vida media plasmática del conjugado. Además, el documento WO 2006/081249 no enseña ni sugiere que pueda aumentarse la vida media plasmática de proteínas cuando la proteína conjugada comprende una repetición de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar tal como se muestra en la presente invención. Además, las repeticiones de aminoácidos dadas a conocer en el documento WO 2006/081249 comprenden al menos dos residuos seleccionados de Gly, Asn, y Gln, que está en claro contraste con las repeticiones de polipéptido de la presente invención que consisten preferentemente en residuos de Ala, Ser y Pro.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "actividad biológica" describe el efecto biológico de una sustancia sobre materia viva. Por consiguiente, las expresiones "proteína biológicamente activa" o "polipéptido que tiene y/o que media una actividad biológica" tal como se usa en el presente documento se refieren a proteínas o polipéptidos que pueden inducir un efecto biológico en células/organismos vivos que se exponen a dicha proteína o polipéptido. Sin embargo, ha de observarse que en el contexto de la presente invención, la expresión "proteína biológicamente activa" se refiere a la proteína de la invención completa que comprende tanto una secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica y una secuencia de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar.

Por consiguiente, las expresiones "secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una actividad biológica" o "secuencia de aminoácidos con actividad biológica" tal como se usa en el presente documento se refieren al "primer dominio" definido anteriormente de la proteína biológicamente activa de la invención, que media o que tiene o que puede mediar o tener "actividad biológica" definida anteriormente. Las expresiones "secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una actividad biológica" o "secuencia de aminoácidos con actividad biológica" también se refieren a un "polipéptido biológicamente activo" o "tramo de polipéptido biológicamente activo" de la invención y están relacionadas con el "primer dominio" de dicha proteína biológicamente activa. También están comprendidos en las expresiones "secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una actividad biológica" o "secuencia de aminoácidos con actividad biológica" fragmentos funcionales de cualquier proteína de interés, cuya vida media, o bien *in vivo* o bien *in vitro*, es necesario prolongar. En una realización de esta invención, la secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una actividad biológica según la presente invención puede deducirse a partir de cualquier "proteína de interés", es decir, cualquier proteína de interés farmacéutico o biológico o cualquier proteína que es útil como agente terapéutico/de diagnóstico. Por consiguiente, las proteínas biológicamente activas según la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos biológicamente activa que se deriva de polipéptidos producidos de manera natural o polipéptidos producidos mediante tecnología de ADN recombinante. En una realización preferida, la proteína de interés puede seleccionarse del grupo que consiste en proteínas de unión, inmunoglobulinas, fragmentos de anticuerpo, proteínas de transporte, proteínas/péptidos de señalización tales como citocinas, factores de crecimiento, hormonas o enzimas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de unión" se refiere a una molécula que puede interaccionar específicamente con (una) posible(s) pareja(s) de unión de modo que permite discriminar entre dicha(s) pareja(s) de unión y una pluralidad de moléculas diferentes como dicha(s) pareja(s) de unión hasta tal medida que, de una combinación de dicha pluralidad de moléculas diferentes como posible(s) pareja(s) de unión, sólo dicha(s) posible(s) pareja(s) de unión se une(n), o se une(n) significativamente. Se conocen en la técnica métodos para la medición de la unión de una proteína de unión a una posible pareja de unión y pueden realizarse de manera rutinaria, por ejemplo, usando ensayos ELISA, calorimetría de valoración isotérmica, diálisis en equilibrio, de interacción (*pull down*) o un aparato Biacore. Las proteínas de unión a modo de ejemplo que son útiles en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo tales como

fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), regiones variable aisladas de anticuerpos (regiones VL y/o VH), CDR, anticuerpos de un solo dominio, peptidomiméticos derivados de CDR, lectinas, lipocalinas o diversos tipos de proteínas de unión derivadas de andamiajes tal como se describe, por ejemplo, en Skerra (2000) *J Mol Recognit* 13:167-187 o Binz (2005) *Nat Biotechnol* 23:1257-1268.

- 5 Otras proteínas biológicamente activas de interés a modo de ejemplo que son útiles en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a factor estimulante de colonias de granulocitos, hormona de crecimiento humana, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , interferón  $\gamma$ , factor de necrosis tumoral, eritropoyetina, factores de coagulación tales como factor de coagulación VIII, gp120/gp160, receptores solubles I y II del factor de necrosis tumoral, trombolíticos tales como reteplasa, exendina-4, antagonistas del receptor de interleucina-1 tales como anakinra, interleucina-2 y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos o los enumerados en Walsh (2003) *Nat Biotechnol* 21:865-870 o Walsh (2004) *Eur J Pharm Biopharm* 58:185-196.

15 La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL; también denominada lipocalina de neutrófilos humanos, 24p3, uterocalina, siderocalina o lipocalina relacionada con neu) tal como se mencionó anteriormente en el presente documento es un miembro de la familia de la lipocalina de proteínas de unión, que se identificó por primera vez como componente de los gránulos de neutrófilos. Se mostró que NGAL se unía estrechamente al sideróforo de tipo catecolato Fell-enteroquelina/enterobactina (Goetz (2002) *Mol Cell* 10:1033-1043) así como algunos otros sideróforos de micobacterias, incluyendo carboximicobactinas de *M. tuberculosis* (Holmes (2005) *Structure* 13:29-41). Estos sideróforos son quelantes de hierro sumamente potentes que se secretan por bacterias patógenas en respuesta a concentraciones limitantes de hierro, tal como se producen en los líquidos corporales humanos, y permiten la captación de hierro por sistemas de importación bacterianos especializados. Por tanto, parece que los neutrófilos liberan NGAL (recientemente también denominada "siderocalina") en sitios de infección como estrategia antimicrobiana del sistema inmunitario innato. La relevancia fisiológica de NGAL se ha investigado en ratones deficientes correspondientes y mostró que limitaba el crecimiento de bacterias que producen enteroquelina (Flo (2004) *Nature* 432:917-921). Por consiguiente, NGAL podría aplicarse como una clase novedosa de antibiótico que actúa impidiendo la captación de hierro bacteriana. Aparte de eso, se describió que NGAL participaba en una ruta fisiológica para la recuperación de hierro por el riñón (Yang (2002) *Mol Cell* 10:1045-1056). Recientemente se demostró que este mecanismo previene la lesión por isquemia-reperusión del riñón en un modelo de ratón de insuficiencia renal grave (Mori (2005) *J Clin Invest* 115:610-621), que podría abrir otra área de aplicación terapéutica.

30 Aún en otra realización, la presente invención se refiere a la proteína biológicamente activa de la invención, en la que dicho primer dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que codifica para un polipéptido que tiene y/o que media dicha actividad biológica y dicho segundo dominio que forma una conformación de espiral al azar están conectados por un conector de polipéptido. Este conector de polipéptido, insertado entre dicho primer y dicho segundo dominios, comprende preferiblemente varios aminoácidos de enlaces peptídicos, hidrófilos que se unen covalentemente a estos dominios. Aún en otra realización dicho conector de polipéptido comprende un sitio de escisión de proteasas plasmáticas que permite la liberación controlada de dicho primer dominio que comprende un polipéptido que tiene y/o que media una actividad biológica. Pueden identificarse conectores de diferentes tipos o longitudes sin una carga excesiva para obtener actividad funcional total de polipéptidos específicos.

40 En una realización preferida, las proteínas biológicamente activas de la presente invención son proteínas de fusión. Una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento pretende comprender al menos un dominio que media una actividad biológica y al menos otro dominio que forma una conformación de espiral al azar en un único polipéptido de múltiples dominios. En una realización alternativa, la proteína biológicamente activa según la presente invención puede representar un conjugado de proteína en el que una proteína de interés o un polipéptido/tramo de polipéptido/secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una actividad biológica se conjuga mediante un enlace no peptídico a una secuencia de aminoácidos que forma una conformación de espiral al azar. Se conocen en la técnica enlaces no peptídicos que son útiles para reticular proteínas y pueden incluir enlaces disulfuro, por ejemplo, entre cadenas laterales de Cys, enlaces tioéter o enlaces covalentes no peptídicos inducidos por agentes de reticulación químicos, tales como suberato de disuccinimidilo (DSS) o 4-[p-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMPB), así como interacciones proteína-proteína no covalentes.

50 Ha de observarse que la "proteína biológicamente activa" de la presente invención también puede comprender más de una "secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una actividad biológica", es decir, el "primer dominio" definido en el presente documento de la proteína biológicamente activa no se limita en el contexto de esta invención a una única actividad biológica de interés. Además, el experto en la técnica es consciente de que la "secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una actividad biológica" y el "dominio/parte de espiral al azar" comprendido en las proteínas biológicamente activas de la invención pueden organizarse en un orden específico. Un ejemplo no limitativo de una "proteína biológicamente activa" de la presente invención que comprende un dominio/parte de espiral al azar (es decir, una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido y que forma una espiral al azar) y dos secuencias de aminoácidos que tienen y/o que median diferentes actividades biológicas, el orden de dominios puede ser: "secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una primera actividad biológica" - "dominio/parte de espiral al azar" - "secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una segunda actividad biológica".

Por consiguiente, y en el contexto de la invención, el orden del “primer” y “segundo” dominios definidos en el presente documento del polipéptido biológicamente activo de la invención puede disponerse en cualquier orden, mediante lo cual dicho “primer dominio” (es decir, proteína de interés; “secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica,”) está ubicado en el extremo amino-(N-)terminal y dicho “segundo dominio” (es decir, el dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido que forma/que adopta una conformación de espiral al azar) está ubicado en el extremo carboxilo-(C-)terminal del polipéptido de la invención. Sin embargo, también puede invertirse este orden, por ejemplo, dicho “primer dominio” (es decir, proteína de interés; “secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica”) está ubicado en el extremo carboxilo-(C-)terminal y dicho “segundo dominio” (es decir, el dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido que forma/que adopta una conformación de espiral al azar) está ubicado en el extremo amino-(N-)terminal del polipéptido de la invención.

Sin embargo, tal como se señaló anteriormente, también se prevé que vaya a usarse más de un dominio que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica en el contexto del constructo de polipéptido de la invención. Por consiguiente, dicho “segundo dominio” (es decir, el dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido que forma/que adopta una conformación de espiral al azar) puede estar ubicado entre dichos “primeros dominios”, siendo tramos de aminoácidos que tienen y/o median una actividad biológica de interés o deseada. El “tramo de espiral al azar” puede, por tanto, estar ubicado entre los dos dominios que tienen y/o que median la actividad biológica deseada. Como con todas las realizaciones del presente polipéptido/proteína biológicamente activo de la invención, dicho(s) dominio(s) que comprende(n) una secuencia de aminoácidos que tiene(n) y/o que media(n) dicha actividad biológica también puede(n) ser un fragmento biológicamente activo de una proteína dada con una función biológica deseada. Por tanto, el “segundo dominio” definido en el presente documento (una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido que forman una espiral al azar) también puede estar ubicado entre dos fragmentos biológicamente activos de una proteína de interés o entre fragmentos biológicamente activos de dos proteínas de interés. Sin embargo, también cuando más de un dominio “que tiene y/o que media una actividad biológica” va a estar comprendido en la proteína biológicamente activa de esta invención, el “segundo dominio” definido en el presente documento, es decir, la secuencia de aminoácidos que consiste en al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido que forma una conformación de espiral al azar, puede estar ubicada en el extremo N- o C-terminal de la proteína activa biológica de esta invención. Ejemplos no limitativos, correspondientes que comienzan en el extremo N-terminal, son:

“secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una primera actividad biológica” - “dominio/parte de espiral al azar” - “secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una segunda actividad biológica”

o

“secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una primera actividad biológica” - “secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una segunda actividad biológica” - “dominio/parte de espiral al azar”

o

“dominio/parte de espiral al azar” - “secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una primera actividad biológica” - “secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una segunda actividad biológica”

El/los orden/órdenes correspondiente(s) también se prevé(n) cuando la representación comienza desde el extremo C-terminal de la proteína/polipéptido biológicamente activo de la presente invención. La expresión “dominio/parte de espiral al azar” tal como se usa en el presente documento en las representaciones anteriores corresponde al “segundo dominio” tal como se define en el presente documento, es decir, a una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido que adopta/tiene una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. De nuevo, ha de señalarse que la expresión “secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media una primera actividad biológica” no se limita a polipéptidos de longitud completa que tienen y/o median dicha actividad o función biológica, sino también a fragmentos biológica y/o farmacológicamente activos de los mismos. Especialmente, pero no sólo, en un contexto en el que dos o más “primeros dominios” tal como se definen en el presente documento están comprendidos en la “proteína biológicamente activa” de la invención, también se prevé que estos “primeros dominios” sean o representen diferentes partes de un complejo de proteína o fragmentos de tales partes del complejo de proteína.

Además, también se prevé que vaya a usarse más de un dominio que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido que forma/que adopta una conformación de espiral al azar en el contexto del constructo de polipéptido de la invención. Por consiguiente, dicho “primeros dominios”, que son tramos de aminoácidos que tienen y/o median una actividad biológica de interés o deseada pueden estar ubicados entre dos “segundo dominios” (es decir, dominios que comprenden una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido que forma/que adopta una conformación de espiral al azar). Por tanto los “tramos de espiral al azar” pueden estar ubicados tanto en el extremo N-terminal como C-terminal del dominio que tiene y/o que media la actividad biológica deseada.

Tal como se pone como ejemplo a continuación en el presente documento, las proteínas biológicamente activas de la invención que se modifican para comprender un dominio de espiral al azar presentan sorprendentemente una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* en comparación con proteínas biológicamente activas no modificadas que carecen de dicho dominio de espiral al azar. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "estabilidad *in vivo*" se refiere a la capacidad de una sustancia específica que se administra al organismo vivo para permanecer biológicamente disponible y biológicamente activa. *In vivo*, una sustancia puede eliminarse y/o inactivarse debido a excreción, agregación, degradación y/o otros procesos metabólicos. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, las proteínas biológicamente activas que tienen una estabilidad aumentada *in vivo* pueden excretarse peor a través de los riñones (orina) o a través de las heces y/o pueden ser más estables frente a la proteólisis, en particular frente a la proteólisis *in vivo* en líquidos biológicos, como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y linfa. En una realización, la estabilidad aumentada *in vivo* de una proteína biológicamente activa se manifiesta en una vida media plasmática prolongada de dicha proteína biológicamente activa.

Se conocen en la técnica métodos para medir la estabilidad *in vivo* de proteínas biológicamente activas. Tal como se pone como ejemplo a continuación en el presente documento, las proteínas biológicamente activas pueden detectarse específicamente en el plasma sanguíneo usando técnicas de inmunotransferencia de tipo Western o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Sin embargo, el experto en la técnica es consciente de que pueden emplearse otros métodos para medir específicamente la vida media plasmática de una proteína de interés. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a la detección física de una proteína de interés marcada radiactivamente. Se conocen en la técnica métodos para el marcaje radiactivo de proteínas, por ejemplo, mediante radioyodación.

La expresión "estabilidad aumentada *in vitro*" tal como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de una proteína biológicamente activa para resistir la degradación y/o agregación y mantener su actividad biológica original en un entorno *in vitro*. Se conocen bien en la técnica métodos para medir la actividad biológica de proteínas biológicamente activas.

En otra realización, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican para las proteínas biológicamente activas tal como se describen en el presente documento. Por consiguiente, dicha molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que tiene actividad biológica y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que forma/adopta una conformación de espiral al azar. Aún en otra realización dicha molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para una de las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en el presente documento que forman/adoptan una conformación de espiral al azar. La expresión "molécula de ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ácido nucleico tales como moléculas de ADN y moléculas de ARN. Dicha molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico puede estar comprendida en un vector.

Además, se prevé transfectar células con la molécula de ácido nucleico o los vectores tal como se describen en el presente documento. En una realización adicional, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que tras la expresión codifican para las proteínas biológicamente activas de la invención. Sin embargo, en una realización adicional, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que tras la expresión codifican para los polipéptidos dados a conocer en el presente documento que, en su totalidad o en parte, forman/adoptan una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden fusionarse a secuencias de control de la expresión adecuadas conocidas en la técnica para garantizar la transcripción y traducción apropiadas del polipéptido así como secuencias señal para garantizar la secreción celular o direccionamiento a orgánulos. Tales vectores pueden comprender además genes tales como genes marcadores que permiten la selección de dicho vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está comprendida en un vector recombinante en el que una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína biológicamente activa descrita en el presente documento se une operativamente a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariontas o eucariotas. La expresión de dicha molécula de ácido nucleico comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico en un ARNm que puede traducirse. Los elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procariontas comprenden, por ejemplo, el promotor lambda PL, lac, trp, tac, tet o T7 en *E. coli*. Los expertos en la técnica conocen bien posibles elementos reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferiblemente células de mamífero o levadura. Habitualmente comprenden secuencias reguladoras que garantizan la iniciación de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción así como de la traducción, y/o regiones promotoras asociadas de manera natural o heterólogas. Ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de CMV, SV40, VSR (virus del sarcoma de Rous), potenciador de CMV, potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamífero y otros animales. Aparte de los elementos que son responsables de la iniciación de la transcripción, tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio de poli-A de SV40 o el sitio de poli-A de tk, en el sentido de 3' de la región codificante.

Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la técnica para construir vectores recombinantes (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory N.Y. y Ausubel (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). En este contexto, se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados tales como vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcADN1, pcADN3, pPICZalpha A (Invitrogen) o pSPORT1 (GIBCO BRL). Además, dependiendo del sistema de expresión que se use, pueden añadirse secuencias líder que pueden dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo en el medio de cultivo a la secuencia codificante secuencia de la molécula de ácido nucleico de la invención.

La presente invención también se refiere a vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos que se emplean convencionalmente en ingeniería genética que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína biológicamente activa de la invención. Por tanto, la presente invención también se refiere a vectores que comprenden la molécula de ácido nucleico de esta invención. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de direccionamiento o transferencia de genes. Pueden usarse vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus Vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes o virus del papiloma bovino para el suministro de los polinucleótidos o el vector de la invención a poblaciones de células dirigidas. Los vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por consiguiente, la invención se refiere además a una célula que comprende dicha molécula de ácido nucleico o dicho vector. Tales métodos, por ejemplo, incluyen las técnicas descritas en Sambrook (1989), *loc. cit.* y Ausubel (1989), *loc. cit.* Por consiguiente, se utiliza comúnmente la transfección con cloruro de calcio para células eucariotas, mientras que puede usarse el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación para otros huéspedes celulares (véase Sambrook (1989), *loc. cit.*). Como alternativa adicional, las moléculas de ácido nucleico y los vectores de la invención pueden reconstituirse en liposomas para el suministro a células diana. La molécula de ácido nucleico o el vector de la invención que está presente en la célula huésped puede o bien integrarse en el genoma de la célula huésped o bien puede mantenerse de manera extracromosómica. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico y/o el vector de esta invención. Se conocen bien en la técnica células huésped para la expresión de polipéptidos y comprenden células procariotas así como células eucariotas, por ejemplo, células de *E. coli*, células de levadura, células de invertebrados, células CHO, células CHO-K1, células Hela, células de mono COS-1, células de melanoma tales como células de Bowes, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster BHK o HaK y similares.

En un aspecto adicional, la presente invención comprende métodos para la preparación de las proteínas biológicamente activas de la invención que comprende cultivar la célula (huésped) de esta invención y aislar dicha proteína biológicamente activa del cultivo tal como se describe en el presente documento. La proteína biológicamente activa de la invención que comprende un dominio de espiral al azar puede producirse mediante la tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, cultivando una célula que comprende la molécula de ácido nucleico o los vectores descritos que codifican para la proteína biológicamente activa de la invención y aislar dicha proteína biológicamente activa del cultivo. La proteína biológicamente activa de la invención puede producirse en cualquier sistema de cultivo celular adecuado incluyendo células procariotas, por ejemplo, BL21 o JM83 de *E. coli*, o células eucariotas, por ejemplo, células CHO o de la cepa de levadura X-33 de *Pichia pastoris*. Pueden obtenerse líneas celulares adicionales adecuadas conocidas en la técnica de depósitos de líneas celulares, como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). El término "procariotas" pretende incluir células bacterianas mientras que el término "eucariotas" pretende incluir células de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos. Los huéspedes transformados pueden hacerse crecer en fermentadores y cultivarse según técnicas conocidas en la técnica para lograr un crecimiento celular óptimo. En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una proteína biológicamente activa descrita anteriormente que comprende cultivar una célula de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína biológicamente activa y aislar la proteína biológicamente activa de la célula o el medio de cultivo.

La proteína biológicamente activa de la invención puede aislarse del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de membranas celulares. El aislamiento y la purificación de los polipéptidos expresados de la invención puede realizarse mediante cualquier medio convencional (Scopes (1982), "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y.), incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares y puede implicar el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, contra una cola fusionada con la proteína biológicamente activa de la invención. Por ejemplo, la proteína puede purificarse mediante *Strep-tag II* usando cromatografía de afinidad con estreptavidina (Skerra (2000) *Methods Enzymol* 326:271-304) tal como se describe en los ejemplos adjuntos. Se prefieren polipéptidos sustancialmente puros con una homogeneidad de al menos aproximadamente el 90 al 95 %, y los más preferidos con una homogeneidad del 98 al 99 % o más, para usos farmacéuticos. Dependiendo del huésped empleado en el procedimiento de producción, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden no estar glicosilados.

La invención se refiere además al uso de la proteína biológicamente activa de la invención, la molécula de ácido

nucleico de la invención, el vector de la invención o la célula (huésped) de la invención para la preparación de un medicamento, en el que dicha proteína biológicamente activa tiene una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro*.

5 Aún en otra realización, la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento de enfermedades y/o trastornos que se benefician de la estabilidad mejorada de dicha proteína biológicamente activa, que comprende administrar la proteína biológicamente activa tal como se describe en el presente documento a un mamífero que necesita tal tratamiento. Dependiendo de la actividad biológica de la proteína de la invención, el experto puede determinar fácilmente qué enfermedad/trastorno va a tratarse con una proteína biológicamente activa específica de la invención. Se enumeran algunos ejemplos no limitativos en la siguiente tabla:

<b>proteína biológicamente activa (o un fragmento biológicamente activo de la misma)</b>	<b>trastorno/enfermedad que va a tratarse</b>
factor estimulante de colonias de granulocitos	cáncer y/o neutropenia relacionada con quimioterapia
hormona de crecimiento humana	retraso del crecimiento y/o hiperglucemia relacionados con deficiencia de la hormona de crecimiento
interferón alfa	cáncer, infección viral, hepatitis C
interferón beta	enfermedad autoinmunitaria, esclerosis múltiple
interferón gamma	infección viral
factor de necrosis tumoral	cáncer
eritropoyetina	anemia
factor de coagulación VIII	hemofilia
gp120/gp160	VIH
receptores solubles I y II del factor de necrosis tumoral	enfermedad inflamatoria
reteplasa	trombosis, infarto de miocardio
exendina-4	diabetes
antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1 ra; anakinra)	enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide
interleucina-2	cáncer
insulina	diabetes
asparaginasa	leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin
onconasa	mesotelioma maligno y otros tipos de cáncer
estreptocinasa	trastornos trombóticos
lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos	infección microbiana, lesión por reperfusión renal
anticuerpos y sus fragmentos, incluyendo anticuerpos de un solo dominio, fragmentos de cadena sencilla y otros modificados por ingeniería genética incluyendo peptidomiméticos de CDR y CDR	enfermedades inmunológicas, oncológicas, neovasculares e infecciosas etc.

10 La presente invención también se refiere al uso de las moléculas de ácido nucleico, vectores así como células transfectadas que comprenden las moléculas de ácido nucleico o los vectores de la presente invención en enfoques médicos, como, por ejemplo, enfoques de terapia génica basados en células o enfoques de terapia génica basados en ácidos nucleicos.

15 En una realización adicional, la proteína biológicamente activa de la invención que comprende el "primer" y "segundo" dominios definidos en el presente documento (o la molécula de ácido nucleico o el vector o la célula huésped de la presente invención) de la invención es parte de una composición. Dicha composición puede comprender una o más de las proteínas biológicamente activas de la invención o moléculas de ácido nucleico, vectores o células huésped que codifican para y/o expresan las mismas.

20 Dicha composición puede ser una composición farmacéutica, que comprende además opcionalmente un diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de la proteína biológicamente activa descrita en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, el tratamiento o la mejora de enfermedades que requieren la captación de una composición farmacéutica de este tipo.

25 En una realización adicional, la composición tal como se describe en el presente documento puede ser una composición para diagnóstico, que comprende además opcionalmente medios adecuados para la detección, en la que dicha composición para diagnóstico tiene una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro*.

Las composiciones de la invención pueden estar en forma líquida o sólida y pueden estar, entre otros, en una forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) disolución/disoluciones o (un) aerosol(es). Además, se prevé que el medicamento de la invención podría comprender además agentes biológicamente activos, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

5 La administración de las composiciones (farmacéuticas) adecuadas puede efectuarse mediante diferentes vías, por ejemplo, mediante administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, tópica, intrabronquial, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las administraciones parenterales incluyen administración intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intravenosa o intraarterial. Las composiciones de la invención también pueden administrarse directamente al sitio diana, por ejemplo, mediante administración biolística a un sitio diana externo o interno, como un órgano afectado específicamente.

10 Se conocen bien en la técnica ejemplos de portadores, excipientes y/o diluentes farmacéuticos adecuados e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Pueden formularse composiciones que comprenden tales portadores mediante métodos convencionales bien conocidos. Los portadores adecuados pueden comprender cualquier material que, cuando se combina con la proteína biológicamente activa de la invención, retiene la actividad biológica de la proteína biológicamente activa (véase Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición, Osol, A. Ed). Las preparaciones para administración parenteral pueden incluir disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles, acuosas o no acuosas. Los tampones, disolventes y/o excipientes empleados en el contexto de la composición farmacéutica son preferiblemente "fisiológicos" tal como se definió anteriormente en el presente documento. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir disolución de cloruro de sodio, Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir disolución de reposición de líquidos y nutrientes, disoluciones de reposición de electrolitos (tales como las basadas en Ringer con dextrosa), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos incluyendo, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención podría comprender portadores proteicos, como, por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobulina, de origen preferiblemente humano.

20 Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación estará determinado por el médico encargado y por factores clínicos. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que vaya a administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que estén administrándose de manera concurrente. El material farmacéuticamente activo puede estar presente en cantidades de entre 1 µg y 20 mg/kg de peso corporal por dosis, por ejemplo, entre 0,1 mg y 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre 0,5 mg y 5 mg/kg de peso corporal. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto. Sin embargo, también se prevén dosis por encima o por debajo de los intervalos indicados a modo de ejemplo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente.

25 Además, se prevé que la composición farmacéutica de la invención podría comprender agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Estos agentes biológicamente activos adicionales puede ser, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, hormonas, factores de crecimiento, enzimas, moléculas de unión, citocinas, quimiocinas, moléculas de ácido nucleico y fármacos.

30 Ha de observarse que la presente invención no se limita a composiciones farmacéuticas. También se prevén composiciones que van a usarse en investigación como agente(s) de diagnóstico. Se prevé, por ejemplo, que las proteínas biológicamente activas que comprenden un dominio de espiral al azar tal como se define en el presente documento, se usen en una práctica de diagnóstico. Para tal fin, la proteína biológicamente activa de la invención de esta invención, que comprende el "primer" y "segundo" dominios definidos en el presente documento, puede marcarse de manera que puede detectarse. Tales marcadores comprenden, pero no se limitan a marcadores radiactivos (como [<sup>3</sup>H]hidrógeno [<sup>125</sup>I]yoduro o [<sup>123</sup>I]yoduro), marcadores fluorescentes (incluyendo pero sin limitarse a proteínas fluorescentes, como la proteína fluorescente verde (GFP) o fluoróforos, como isotiocianato de fluoresceína (FITC)) o marcadores de RMN (como quelatos de gadolinio). Las etiquetas o marcadores definidos en el presente documento no son limitativos en modo alguno y simplemente representan ejemplos ilustrativos. Las composiciones de diagnóstico de esta invención son particularmente útiles en experimentos de seguimiento o en una práctica médica de diagnóstico.

35 Aún en otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende la proteína biológicamente activa, la molécula de ácido nucleico que codifica para dicha proteína biológicamente activa, el vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico o la célula que comprende dicho ácido nucleico o dicho vector tal como se describe en el presente documento. Ventajosamente, el kit de la presente invención comprende además, opcionalmente (un) tampón/tampones, disoluciones de almacenamiento y/o el resto de reactivos o materiales requeridos para llevar a

cabo fines y ensayos médicos, científicos o de diagnóstico. Además, partes del kit de la invención pueden envasarse individualmente en viales o botellas o en combinación en recipientes o unidades de múltiples recipientes.

El kit de la presente invención puede usarse ventajosamente, entre otros, para llevar a cabo el método de la invención y podría emplearse en una variedad de aplicaciones referidas en el presente documento, por ejemplo, como kits de diagnóstico, como herramientas de investigación o como herramientas médicas. Adicionalmente, el kit de la invención puede contener medios para la detección adecuada para fines científicos, médicos y/o de diagnóstico. La fabricación de los kits sigue preferiblemente procedimientos convencionales que conocen el experto en la técnica.

La invención se ilustra a continuación mediante los siguientes ejemplos y figuras no limitativos.

## 10 Figuras

Figura 1: Diseño génico para las secuencias del polímero Pro-Ala-Ser#1 (PAS#1; SEQ ID NO: 18), Pro-Ala-Ser#2 (PAS#2; SEQ ID NO: 20), Pro-Ala-Ser#3 (PAS#3; SEQ ID NO: 22), (Pro-Ala-Ser#5 (PAS#5; SEQ ID NO: 26), Pro-Ala-Ser#1P2 (PAS#1P2; SEQ ID NO: 28) y Ser-Ala (piSA; SEQ ID NO: 2).

15 (A) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados de un elemento estructural para PAS#1 (SEQ ID NO: 29 y 30, respectivamente) obtenido mediante hibridación de dos oligodesoxinucleótidos complementarios, con dos extremos cohesivos (letras minúsculas) que son compatibles con los sitios de restricción *EcoO109I* y *SapI*.

20 (B) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados de un elemento estructural para PAS#2 (SEQ ID NO: 31 y 32, respectivamente) obtenido mediante hibridación de dos oligodesoxinucleótidos complementarios, con dos extremos cohesivos (letras minúsculas) que son compatibles con sitios de restricción *EcoO109I* y *SapI*.

25 (C) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados de un elemento estructural para PAS#3 (SEQ ID NO: 33 y 34, respectivamente) obtenido mediante hibridación de dos oligodesoxinucleótidos complementarios, con dos extremos cohesivos (letras minúsculas) que son compatibles con sitios de restricción *EcoO109I* y *SapI*.

(D) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados de un elemento estructural para PAS#5 (SEQ ID NO: 35 y 36, respectivamente) obtenido mediante hibridación de dos oligodesoxinucleótidos complementarios, con dos extremos cohesivos (letras minúsculas) que son compatibles con sitios de restricción *EcoO109I* y *SapI*.

30 (E) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados de un elemento estructural para PAS#1P2 (SEQ ID NO: 39 y 40, respectivamente) obtenido mediante hibridación de dos oligodesoxinucleótidos complementarios, con dos extremos cohesivos (letras minúsculas) que son compatibles con sitios de restricción *EcoO109I* y *SapI*.

35 (F) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados de un elemento estructural para piSA (SEQ ID NO: 37 y 38, respectivamente) obtenido mediante hibridación de dos oligodesoxinucleótidos complementarios, con dos extremos cohesivos (letras minúsculas) que son compatibles con sitios de restricción *EcoO109I* y *SapI*.

Figura 2: Estrategia de clonación para las secuencias del polímero de Pro-Ala-Ser como una fusión a IFNa2b e IL-1ra.

40 (A) Tramo de la secuencia de nucleótidos de pASK-2xSapI, un derivado de pASK75, usado para subclonar la secuencia polimérica (SEQ ID NO: 55). La secuencia de nucleótidos codifica para dos sitios de restricción *SapI* en la orientación complementaria inversa, lo que conduce tras la digestión a extremos salientes que son compatibles con los casetes génicos sintéticos mostrados en la figura 1 (indicados mediante barras). Las secuencias de reconocimiento están subrayadas.

45 (B) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 41 y 42, respectivamente) del polímero PAS#1 con 200 residuos tras la inserción en el plásmido pASK-2xSapI, que da como resultado pPAS(#1)200. Los sitios de restricción *SapI* que flanquean la secuencia polimérica están marcados (las secuencias de reconocimiento están subrayadas).

50 (C) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 43 y 44, respectivamente) de IFNa2b tras la clonación en pASK-IBA4 (IBA GmbH, Göttingen). Los sitios de restricción individuales *KasI* y *HindIII* usados para la clonación de la proteína de fusión así como el sitio de restricción individual *SapI* para la inserción de la secuencia polimérica están marcados (las secuencias de reconocimiento están subrayadas). Los dos aminoácidos C-terminal de Strep-tag II están subrayados. El primer aminoácido del IFNa2b maduro está marcado con +1.

(D) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados del extremo N-terminal de IFNa2b tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1 (SEQ ID NO: 45 y 46, respectivamente). Los sitios de restricción individuales *KasI*, *HindIII* y *SapI* están marcados (las secuencias de reconocimiento están subrayadas). El primer aminoácido de IFNa2b como parte de la proteína de fusión está marcado (1) y los dos aminoácidos C-terminal de Strep-tag II están subrayados.

(E) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 47 y 48, respectivamente) de IL-1ra tras la clonación en pASK-IBA4 (IBA GmbH, Göttingen). Los sitios de restricción individuales *KasI* y *HindIII* usados para la clonación de la proteína de fusión así como el sitio de restricción individual *SapI* para la inserción de la secuencia polimérica están marcados (las secuencias de reconocimiento están subrayadas). Los dos aminoácidos C-terminal de Strep-tag II están subrayados. El primer aminoácido de IL-1ra maduro está marcado con +1.

(F) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados del extremo N-terminal de IL-1ra tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1 (SEQ ID NO: 49 y 50, respectivamente). Los sitios de restricción individuales *KasI*, *HindIII* y *SapI* están marcados (las secuencias de reconocimiento están subrayadas). El primer aminoácido de IL1ra como parte de la proteína de fusión está marcado (1) y los dos aminoácidos C-terminal de Strep-tag II están subrayados.

G) Mapa plasmídico de pPAS(#1)200-IFNa2b. El gen estructural para PAS(#1)200-IFNa2b (que comprende el péptido señal bacteriano *OmpA*, Strep-tag II, el polímero PAS#1 con 200 residuos, es decir, 10 copias repetitivas de la secuencia mostrada en la figura 1A, PAS(#1)200 e IFNa2b humano) está bajo el control transcripcional del promotor/operador de tetraciclina ( $tet^{p/o}$ ) y termina con el terminador de lipoproteína ( $t_{pp}$ ). La estructura principal del plásmido, es decir, fuera del casete de expresión flanqueado por los sitios de restricción *XbaI* y *HindIII*, es idéntica a la del vector de expresión y clonación genérico pASK75 (Skerra (1994) Gene 151:131-135). Los sitios de restricción individuales están indicados. Los vectores de expresión para PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b son idénticos excepto en que el polímero PAS#1 con 400 ó 600 residuos, es decir, 20 ó 30 copias repetitivas de la secuencia mostrada en la figura 1A, está codificado en vez de PAS(#1)200. De manera similar, los vectores de expresión para PAS(#2)200-IFNa2b y PAS(#3)200-IFNa2b portan un polímero PAS#2 o PAS#3 de 200, es decir, 10 copias repetitivas de las secuencias mostradas en las figuras 1B y 1C, respectivamente. De manera similar, los vectores de expresión para PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b portan un polímero PAS#5 de 192 ó 384 residuos, es decir, 8 ó 16 copias repetitivas de las secuencias mostradas en la figura 1D. De manera similar, el vector de expresión para PAS(#1P2)140-IFNa2b porta un polímero PAS#1P2 de 140 residuos, es decir, 7 copias repetitivas de la secuencia mostrada en la figura 1E. Los vectores de expresión para PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra y PAS(#5)384-IL1ra son similares a los vectores correspondientes para IFNa2b excepto porque portan el gen codificante para IL-1ra en vez de IFNa2b.

Figura 3: Estrategia de clonación para las secuencias del polímero de Pro-Ala-Ser y Ser-Ala según la figura 1 como una fusión con respecto a lipocalina humana asociada a gelatinasa de neutrófilos, NGAL.

(A) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 51 y 52, respectivamente) del extremo C-terminal (subrayado) de una variante de NGAL que porta Strep-tag II (secuencia de aminoácidos en cursiva), clonada en el derivado de pASK75, pNGAL15 (Breustedt (2006) Biochim Biophys Acta 1764:161-173). Se introdujo del sitio de restricción *EcoO1091* en la unión de ambas regiones codificantes, lo que conduce tras digestión a extremos salientes que son compatibles con el casete génico sintético (indicado mediante barras), lo que produce pNGAL15-Eco. El sitio de restricción *HindIII* único en el extremo 3' del casete de expresión está marcado (la secuencia de reconocimiento está subrayada).

(B) Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos codificados (SEQ ID NO: 53 y 54, respectivamente) del extremo C-terminal de NGAL tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1, seguido por Strep-tag II (cursiva). El sitio de restricción *HindIII* único en el extremo 3' del casete de expresión génica está marcado (la secuencia de reconocimiento está subrayada).

(C) Mapa plasmídico de pNGAL-PAS(#1)200. El gen estructural para NGAL-PAS(#1)200 (que comprende el péptido señal *OmpA*, el NGAL modificado, y PAS#1 con 200 residuos, PAS(#1)200, así como Strep-tag II) está bajo el control transcripcional del promotor/operador de tetraciclina ( $tet^{p/o}$ ) y termina con el terminador de lipoproteína ( $t_{pp}$ ). La estructura principal del plásmido, es decir, fuera del casete de expresión flanqueado por los sitios de restricción *XbaI* y *HindIII*, es idéntica a la del vector de expresión y clonación genérico pASK75 (Skerra (1994) Gene 151:131-135). Los sitios de restricción individuales están indicados. El vector de expresión para NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-piSA100 es idéntico excepto en que el polímero PAS#1 o piSA según la figura 1 con sólo 100 residuos está codificado.

Figura 4: Análisis de IFNa2b, IL-1ra y NGAL recombinantes purificados, así como sus fusiones con polímeros mediante SDS-PAGE, seguido por tinción con azul brillante de Coomassie R-250. Se produjeron las

proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 mediante secreción periplasmática y se purificaron por medio de Strep-tag II usando cromatografía de afinidad a estreptavidina.

(A) Análisis de IFNa2b recombinante purificado y sus fusiones con PAS#1 con 200, 400 ó 600 residuos, respectivamente, mediante SDS-PAGE al 10 %. El gel presenta muestras de proteína de 2 µg cada una de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b. Las muestras en el lado izquierdo se redujeron con 2-mercaptoetanol mientras que las muestras correspondientes en el lado derecho se dejaron sin reducir. Los tamaños de los marcadores proteicos (kDa), aplicados en condiciones reductoras, se indican a la izquierda. Las cuatros proteínas aparecen como bandas homogéneas individuales con tamaños moleculares aparentes de aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 80 kDa, aproximadamente 170 kDa y aproximadamente 300 kDa, respectivamente, en la forma reducida. Estos valores son significativamente mayores que las masas calculadas de 37,4 kDa para PAS(#1)200-IFNa2b, de 54,0 kDa para PAS(#1)400-IFNa2b, y de 70,5 kDa para PAS(#1)600-IFNa2b. Este efecto se debe claramente a los polímeros de Pro-Ala-Ser con diferentes longitudes como el propio IFNa2b, con una masa calculada de 20,9 kDa, presenta movilidad electroforética normal. El IFNa2b en el estado no reducido tiene una movilidad electroforética ligeramente superior debido a la forma más compacta que resulta de sus dos puentes disulfuro intramoleculares.

(B) Análisis de PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b recombinantes purificadas mediante SDS-PAGE al 10 %. El gel presenta muestras de 2 µg de cada proteína. Las muestras en el lado izquierdo se redujeron con 2-mercaptoetanol mientras que las muestras correspondientes en el lado derecho se dejaron sin reducir. Los tamaños de los marcadores proteicos (kDa), aplicados en condiciones reductoras, se indican a la izquierda. Las dos proteínas aparecen como bandas homogéneas individuales con tamaños moleculares aparentes de aproximadamente 75 kDa y de aproximadamente 120 kDa, respectivamente, tanto en el estado reducido como en el no reducido. Esto es significativamente mayor que las masas calculadas de 36,7 kDa para PAS(#5)192-IFNa2b y de 52,6 kDa para PAS(#5)384-IFNa2b. Este efecto se debe de nuevo a los polímeros de Pro-Ala-Ser con diferentes longitudes.

(C) Análisis de PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b, PAS(#1P2)140-IFNa2b e IFNa2b recombinantes purificados mediante SDS-PAGE al 12 %. El gel presenta muestras de 2 µg de cada proteína reducidas con 2-mercaptoetanol. Los tamaños de los marcadores proteicos (kDa) se indican a la izquierda. Las seis proteínas aparecen como bandas homogéneas con tamaños moleculares aparentes de aproximadamente 75 kDa (PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b), 70 kDa (PAS(#5)192-IFNa2b), 40 kDa (PAS(#1P2)140-IFNa2b) y de aproximadamente 20 kDa (IFNa2b), respectivamente. Por tanto, las fusiones con polímeros muestran tamaños significativamente mayores que las masas calculadas de 37,4 kDa para PAS(#1)200-IFNa2b, 37,4 kDa para PAS(#2)200-IFNa2b, 38,6 kDa para PAS(#3)200-IFNa2b, 36,7 kDa para PAS(#5)192-IFNa2b y 31,7 kDa para PAS(#1P2)140-IFNa2b. Este efecto se debe de nuevo a los polímeros de Pro-Ala-Ser con diferentes longitudes.

(D) Análisis de IL-1ra recombinante purificada y sus fusiones con PAS#1 y PAS#5 con 200, 400 ó 192 y 384 residuos, respectivamente, mediante SDS-PAGE al 12 %. El gel presenta muestras de proteína de 2 µg cada una de IL-1ra, PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra y PAS(#5)384-IL1ra reducidas con 2-mercaptoetanol. Los tamaños de los marcadores proteicos (kDa) se indican a la izquierda. Las cinco proteínas aparecen como bandas homogéneas individuales con tamaños moleculares aparentes de aproximadamente 20 kDa, aproximadamente 70 kDa, aproximadamente 140 kDa, 66 kDa y aproximadamente 125 kDa, respectivamente. Para las fusiones con polímeros, estos valores son significativamente mayores que las masas calculadas de 35,3 kDa para PAS(#1)200-IL1ra, de 51,9 kDa para PAS(#1)400-IL1ra, de 34,6 para PAS(#5)192-IL1ra y de 50,5 kDa para PAS(#5)384-IL1ra. Este efecto se debe claramente a los polímeros de Pro-Ala-Ser con diferentes longitudes como el propio IL-1ra, con una masa calculada de 19,8 kDa, presenta movilidad electroforética normal.

(E) Análisis de NGAL recombinante purificada y sus fusiones con polímero PAS#1 con 100 ó 200 residuos, respectivamente, mediante SDS-PAGE al 12 %. El gel presenta muestras de proteínas de 4 µg cada una de NGAL, NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200. Las muestras en el lado izquierdo se redujeron con 2-mercaptoetanol mientras que las muestras correspondientes en el lado derecho se dejaron sin reducir. Los tamaños de los marcadores proteicos (kDa), aplicados en condiciones reductoras, se indican a la izquierda. NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 aparecen como bandas homogéneas individuales con tamaños moleculares aparentes de aproximadamente 45 kDa y de aproximadamente 60 kDa, respectivamente, tanto en el estado reducido como en el no reducido. Esto es significativamente mayor que las masas calculadas de 29,8 kDa para NGAL-PAS(#1)100 y de 38,1 kDa para NGAL-PAS(#1)200. Este efecto se debe a los polímeros de Pro-Ala-Ser con diferentes longitudes como la propia NGAL, con una masa calculada de 21,5 kDa, presenta movilidad electroforética normal.

Figura 5: Análisis cuantitativo de los volúmenes hidrodinámicos de IFNa2b, IL-1ra, NGAL recombinantes purificados, así como sus fusiones con polímeros.

- 5 (A) Cromatografía de permeación en gel analítica de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b. Se aplicaron 250  $\mu$ l de cada proteína a una concentración de 0,25 mg/ml a una columna Superdex S200 10/300 GL equilibrada con solución salina tamponada con fosfato, PBS. Se monitorizó la absorción a 280 nm y se normalizó el pico de cada ejecución cromatográfica hasta un valor de 1. La flecha indica el volumen de exclusión de la columna (8,0 ml).
- 10 (B) Cromatografía de permeación en gel analítica de PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b. Se aplicaron 250  $\mu$ l de la proteína a una concentración de 0,25 mg/ml a una columna Superdex S200 10/300 GL equilibrada con tampón PBS. Se monitorizó la absorción a 280 nm y se normalizó el pico de cada ejecución cromatográfica hasta un valor de 1. La flecha indica los volúmenes de exclusión de la columna (8,0 ml).
- 15 (C) Curva de calibración para los cromatogramas de (A) y (B) usando Superdex S200 10/300 GL. Se representó gráficamente el logaritmo del peso molecular (PM) de las proteínas marcadoras (ARNasa A, 13,7 kDa; anhidrasa carbónica, 29,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina sérica bovina, 66,3 kDa; transferrina, 81,0 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa) frente a sus volúmenes de elución (círculos negros) y se ajustaron mediante una línea recta. A partir de los volúmenes de elución observados de IFNa2b y sus proteínas de fusión (cuadrados negros) se determinaron sus pesos moleculares aparentes tal como sigue: IFNa2b: 22,5 kDa (calculado: 20,9 kDa); PAS(#1)200-IFNa2b: 176 kDa (calculado: 37,4 kDa); PAS(#1)400-IFNa2b: 346 kDa (calculado: 54,0 kDa); PAS(#1)600-IFNa2b: 522 kDa (calculado: 70,5 kDa); PAS(#5)192-IFNa2b: 162 kDa (calculado: 36,7 kDa); PAS(#5)384-IFNa2b: 280 kDa (calculado: 52,6 kDa).
- 20 (D) Cromatografía de permeación en gel analítica de PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b y PAS(#1P2)140-IFNa2b. Se aplicaron 250  $\mu$ l de cada proteína a una concentración de 0,25 mg/ml a una columna Superdex S200 10/300 GL equilibrada con solución salina tamponada con fosfato, PBS. Se monitorizó la absorción a 280 nm y se normalizó el pico de cada ejecución cromatográfica hasta un valor de 1. La flecha indica el volumen de exclusión de la columna ( $V_0 = 8,0$  ml).
- 25 (E) Curva de calibración para los cromatogramas de (D) usando la misma columna Superdex S200 10/300 GL. Se representó gráficamente el logaritmo del peso molecular (PM) de las proteínas marcadoras (ARNasa A, 13,7 kDa; anhidrasa carbónica, 29,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina sérica bovina, 66,3 kDa; transferrina, 81,0 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa) frente a sus volúmenes de elución (círculos negros) y se ajustaron mediante una línea recta. A partir de los volúmenes de elución observados de IFNa2b y sus proteínas de fusión (cuadrados negros) se determinaron sus tamaños moleculares aparentes tal como sigue: PAS(#2)200-IFNa2b: 168 kDa (calculado: 37,4 kDa); PAS(#3)200-IFNa2b: 146 kDa (calculado: 38,6 kDa); PAS(#1P2)140-IFNa2b: 66,4 kDa (calculado: 31,7 kDa).
- 30 (F) Cromatografía de permeación en gel analítica de IL-1ra, PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra y PAS(#5)384-IL1ra. Se aplicaron 250  $\mu$ l de cada proteína a una concentración de 0,25 mg/ml a una columna Superdex S200 10/300 GL equilibrada con solución salina tamponada con fosfato, PBS. Se monitorizó la absorción a 280 nm y se normalizó el pico de cada ejecución cromatográfica hasta un valor de 1. La flecha indica el volumen de exclusión de la columna. Para mejor claridad sólo se muestran los picos.
- 35 (G) Curva de calibración para los cromatograma de (F) usando la misma columna Superdex S200 10/300 GL. Se representó gráficamente el logaritmo del peso molecular (PM) de las proteínas marcadoras (ARNasa A, 13,7 kDa; anhidrasa carbónica, 29,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina sérica bovina, 66,3 kDa; transferrina, 81,0 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa) frente a sus volúmenes de elución (círculos negros) y se ajustaron mediante una línea recta. A partir de los volúmenes de elución observados de IL-1ra y sus proteínas de fusión (cuadrados negros) se determinaron sus tamaños moleculares aparentes tal como sigue: IL-1ra: 19,8 kDa (calculado: 18,8 kDa); PAS(#1)200-IL1ra: 161 kDa (calculado: 35,3 kDa); PAS(#1)400-IL1ra: 336 kDa (calculado: 51,9 kDa); PAS(#5)192-IL1ra: 148 kDa (calculado: 34,6 kDa); PAS(#5)384-IL1ra: 305 kDa (calculado: 50,5 kDa).
- 40 (H) Cromatografía de permeación en gel analítica de NGAL, NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 y NGAL-piSA100. Se aplicaron 250  $\mu$ l de cada proteína a una concentración de 0,25 mg/ml a o bien una columna Superdex S75 10/300 GL (NGAL y NGAL-piSA100) o bien una columna Superdex S200 10/300 GL (NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200) equilibrada con tampón PBS. Se monitorizó la absorción a 280 nm y se normalizó el pico de cada ejecución cromatográfica hasta un valor de 1. La flecha indica los volúmenes de exclusión de las columnas (7,5 ml y 8,2 ml, respectivamente).
- 45 (I) Curvas de calibración para los cromatogramas de (H) usando Superdex S75 10/300 GL y Superdex S200 10/300 GL. Se representó gráficamente el logaritmo del peso molecular (PM) de las proteínas marcadoras (Superdex S75 10/300 GL: aprotinina, 6,5 kDa; ribonucleasa, 13,7 kDa; mioglobina, 17,6 kDa; anhidrasa carbónica, 29,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina sérica bovina, 66,3 kDa; transferrina,
- 50
- 55

81,0 kDa; Superdex S200 10/300 GL: citocromo c, 12,4 kDa; anhidrasa carbónica, 29,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina sérica bovina, 66,3 kDa; transferrina, 81,0 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa) frente a sus volúmenes de elución (círculos negros) y se ajustaron mediante una línea recta. A partir de los volúmenes de elución observados de NGAL y sus proteínas de fusión (cuadrados negros) se determinaron sus pesos moleculares aparentes tal como sigue: NGAL: 21,5 kDa (calculado: 21,5 kDa); NGAL-PAS(#1)100: 72,6 kDa (calculado: 29,8 kDa); NGAL-PAS(#1)200: 106,4 kDa (calculado: 38,1 kDa); NGAL-piSA100: 54 kDa (calculado: 29,4 kDa).

Figura 6: Análisis experimental de la estructura secundaria de IFNa2b, IL-1ra, NGAL recombinantes purificados, así como sus fusiones con polímeros mediante espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Se registraron los espectros a temperatura ambiente en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, fosfato de K 20 mM, pH 7,5 y se normalizaron frente a la elipticidad molar,  $\Theta_M$ , para cada proteína.

(A) Espectros de dicroísmo circular (DC) de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b purificados recombinantes. El espectro de DC para IFNa2b muestra las características típicas de una proteína de hélice  $\alpha$  predominante con dos máximos negativos aproximadamente a 208 nm y 220 nm (Sreerama en: Circular Dichroism - Principles and Applications (2000) Berova, Nakanishi y Woody (Eds.) Wiley, Nueva York: 601-620 que indica el plegamiento correcto de IFNa2B humano producido en bacterias. Los espectros de sus proteínas de fusión con el polímero de Pro-Ala-Ser revelan desviaciones características con un mínimo negativo dominante aproximadamente a 205 nm, que es claramente indicativo de una conformación de espiral al azar. Además, existe un hombro aproximadamente a 220 nm, que resulta de la contribución de las hélices  $\alpha$  e indica el plegamiento correcto de IFNa2b incluso como parte de la proteína de fusión.

(B) Espectros de DC de diferencia molar para PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b obtenidos mediante sustracción del espectro para IFNa2b del de la proteína de fusión respectiva. Los espectros de DC de diferencia para los polímeros PAS#1 con 200, 400 y 600 residuos revelan todos un pico intenso aproximadamente a 200 nm, que es una indicación clara de su conformación de espiral al azar en la disolución acuosa tamponada (Greenfield (1969) Biochemistry 8: 4108-4116; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) EMBO J 21:5682-5690.

(C) Espectros de dicroísmo circular (DC) de PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b y PAS(#1P2)140-IFNa2b recombinantes purificados, junto con el de IFNa2b. Los espectros de las proteínas de fusión con polímero revelan un mínimo negativo dominante aproximadamente a 205 nm, que es indicativo de una conformación de espiral al azar, y un hombro aproximadamente a 220 nm, que resulta de la contribución del IFNa2b plegado correctamente.

(D) Espectros de DC de diferencia molar para PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b y PAS(#1P2)140-IFNa2b tras la sustracción del espectro para IFNa2b. Los espectros de DC de diferencia para los polímeros PAS#2 y PAS#3, cada uno con 200 residuos, y el polímero PAS#1P2, con 140 residuos, revelan un mínimo significativo aproximadamente a 200 nm, que es una indicación clara de una conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*).

(E) Espectros de dicroísmo circular (DC) de PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b recombinantes purificadas. Los espectros de estas dos proteínas de fusión revelan un mínimo negativo dominante aproximadamente a 205 nm, que es indicativo de una conformación de espiral al azar, y un hombro aproximadamente a 220 nm, que resulta de la contribución del IFNa2b plegado.

(F) Espectros de DC de diferencia molar para PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b tras la sustracción del espectro para IFNa2b. Los espectros de DC de diferencia para el polímero PAS#5 con 192 y 384 residuos revelan un mínimo intenso aproximadamente a 200 nm, que es una indicación clara de una conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*).

(G) Espectros de dicroísmo circular (DC) de IL-1ra, PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra y PAS(#5)384-IL1ra recombinantes purificadas. Los espectros de las cuatro proteínas de fusión revelan un mínimo negativo dominante aproximadamente a 200 nm, que es indicativo de una conformación de espiral al azar.

(H) Espectros de DC de diferencia molar para PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra y PAS(#5)384-IL1ra tras la sustracción del espectro para IL-1ra. Los espectros de DC de diferencia tanto para el polímero PAS#1 como para el PAS#5 con 200 ó 400 y 192 ó 384 residuos, respectivamente, revelan un mínimo intenso aproximadamente a 200 nm, que es una indicación clara de una conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*).

(I) Espectros de DC de NGAL, NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 recombinantes purificadas. El

espectro de DC para NGAL tiene la característica típica de una proteína de lámina  $\beta$  predominante con un máximo negativo aproximadamente a 212 nm (Sreerama (2000) *loc. cit.*). La ausencia de la banda positiva por debajo de 200 nm concuerda con el espectro de DC de su ortólogo de ratón 24p3 (Chu (1998) *J Pept Res* 52:390-397). Tomados en conjunto, estos datos soportan el plegamiento correcto de la proteína NGAL producida en bacterias. Los espectros de las dos proteínas de fusión revelan desviaciones características con un mínimo negativo dominante aproximadamente a 195 nm, que es indicativo de una conformación de espiral al azar, y un hombro aproximadamente a 200 nm, que resulta de la contribución de NGAL con su mínimo negativo a 200 nm. Esta última observación indica el plegamiento correcto de la proteína NGAL cuando se fusiona con el polímero de Pro-Ala-Ser.

(J) Espectros de DC de diferencia molar para NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 tras la sustracción del espectro para NGAL. Los espectros de DC de diferencia para el polímero PAS#1 con 100 y 200 residuos revelan un mínimo intenso aproximadamente a 200 nm, que es una indicación clara de una conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*).

(K) Espectros de DC de la NGAL-piSA100 purificada recombinante, y su espectro de DC de diferencia molar tras la sustracción del espectro para NGAL. Tanto el espectro de DC para NGAL-piSA100 como el espectro de DC de diferencia para el polímero piSA100 tienen la característica típica de una proteína de lámina  $\beta$  predominante con un máximo negativo aproximadamente a 218 nm y un máximo positivo por debajo de 200 nm (Sreerama (2000) *loc. cit.*). Por tanto, el espectro de diferencia es claramente diferente de los de las fusiones con polímeros de Pro-Ala-Ser de longitud comparable, que están dominados claramente por una conformación de espiral al azar que puede atribuirse a la pareja de fusión de polímero.

Figura 7: Prueba de estabilidad en suero de PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#5)192-IFNa2b

Se analizó la estabilidad en suero de PAS(#1)200-IFNa2b (A) y PAS(#5)192-IFNa2b (B) mediante la incubación de la proteína de fusión a una concentración de 0,17 mg/ml en plasma de ratón al 83 % v/v (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) a 37°C durante hasta 48 h. Se tomaron muestras (6  $\mu$ l) en los puntos de tiempo indicados y se diluyeron con 54  $\mu$ l de tampón de electroforesis de SDS-PAGE y 15  $\mu$ l de tampón de carga de SDS-PAGE que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol. Se aplicaron alícuotas de 25  $\mu$ l (correspondientes a 0,33  $\mu$ g de proteína de prueba) y una muestra de referencia (0,1  $\mu$ g) a una SDS-PAGE al 12 % y se sometieron a inmunotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa. Se detectaron las proteínas recombinantes mediante incubación con conjugado de fosfatasa alcalina-StrepTactin® (IBA, Göttingen, Alemania), que reconoce Strep-tag II, y se reveló mediante reacción cromogénica.

Para ambas proteínas de prueba, las inmunotransferencias revelan señales de intensidad constante para todos los puntos de tiempo. No pudo detectarse ningún producto de degradación y no hubo ninguna indicación de agregación de proteínas, que conduciría a una disminución de la concentración de proteína prueba, en el transcurso de tiempo investigado.

Figura 8: Farmacocinética del IFNa2b recombinante purificado y sus fusiones con polímero PAS#1 con 200 ó 400 residuos.

Ratones BALB/c con pesos corporales de aproximadamente 25 g recibieron inyecciones de aproximadamente 125  $\mu$ l o bien de proteína IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, o bien de proteína PAS(#1)400-IFNa2b con una concentración de 1 mg/ml en PBS que contenía EDTA 1 mM para lograr una dosis de 5 mg de proteína de prueba por kg de peso corporal (p.c.). Se tomaron muestras de sangre tal como se indica. Se diluyeron 1:5 con PBS alícuotas del plasma aclarado. Se aplicaron a una SDS-PAGE al 12 % alícuotas de 10  $\mu$ l de la muestra diluida (correspondientes a 1  $\mu$ l de plasma), y se sometieron a inmunotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa. Se detectaron las proteínas recombinantes mediante incubación con el anticuerpo de ratón anti-IFNa2b humano 9D3 (Abcam, Cambridge, R.U.) seguido por la incubación con un conjugado de anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se reveló en una reacción cromogénica.

El carril más a la izquierda (M) muestra una mezcla de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b purificados (cada uno 0,1  $\mu$ g, es decir, una cantidad tal como se esperaba para  $t = 0$  en las muestras de plasma) como referencia. Los otros carriles presentan muestras de plasma para IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b en los puntos de tiempo tal como se indica.

La inmunotransferencia revela las mayores señales para las tres muestras de proteína en el punto de tiempo más temprano, es decir, tras 30 min., lo que revela ya una disminución rápida del IFNa2b, que ya no es detectable tras 2 h. En cambio, tanto PAS(#1)200-IFNa2b como PAS(#1)400-IFNa2b son detectables durante hasta 6 h, con una retención obviamente más intensa para la fusión de 400 residuos

en comparación con la fusión de 200 residuos, lo que indica una circulación significativamente prolongada en comparación con la proteína IFNa2b no fusionada. Particularmente, no hubo ninguna indicación de degradación proteolítica para ninguna muestra de proteína. Por tanto, no sólo la proteína de interés IFNa2b sino también el resto de fusión con polímero revelan una alta estabilidad en suero.

- 5 Figura 9: Análisis cuantitativo de la farmacocinética del IFNa2b recombinante purificado y su fusión con polímero PAS#1 con 200 y 400 residuos.

10 Se sometieron a ensayo de forma cuantitativa muestras de plasma de los mismos animales investigados en la figura 8 para determinar las concentraciones de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b o PAS(#1)400-IFNa2b usando un ELISA de tipo sándwich. Por tanto, se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación con el anticuerpo anti-IFNa humano 9D3 (Abcam, Cambridge, R.U.) como anticuerpo de captura y se aplicaron series de dilución de las muestras de plasma de animales del grupo A (inyección de IFNa2b), grupo B (inyección de PAS(#1)200-IFNa2b) y grupo C (inyección de PAS(#1)400-IFNa2b). Se detectaron IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b unidos a un segundo conjugado de anticuerpo anti-IFNa2b humano-HRP (4E10-HRP; Abcam, Cambridge, R.U.), que reconoce un epítipo diferente que el anticuerpo de captura, seguido por la reacción cromogénica. Se cuantificaron las concentraciones de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b mediante comparación con curvas patrón preparadas con las mismas proteínas recombinantes purificadas aplicadas a una concentración conocida. Para estimar la vida media plasmática de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b, se representaron gráficamente los valores de concentración obtenidos frente al tiempo tras la inyección intravenosa y se ajustaron de forma numérica suponiendo una disminución monoexponencial.

20 Como resultado, la proteína IFNa2b no fusionada presentó un aclaramiento muy rápido con una vida media de  $5,5 \pm 1 \times 10^{-5}$  min. En cambio, se retardó significativamente la fase de eliminación determinada para PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b, con vidas medias de  $61,7 \pm 5,4$  min. y aproximadamente  $6 \pm 3$  h, respectivamente, demostrando así una circulación prolongada de más de diez veces y 60 veces debido la fusión con el polímero de Pro-Ala-Ser con 200 y 400 residuos, respectivamente, en comparación con el IFNa2b no fusionado.

- 25 Figura 10: Análisis cuantitativo de la farmacocinética de las fusiones de IFNa2b recombinante purificado-polímero PAS#1 con 200, 400, 600 residuos y fusiones con polímero PAS#5 con 192 y 384 residuos, respectivamente.

30 Ratones C57BL/6 con pesos corporales de aproximadamente 18 g recibieron inyecciones de aproximadamente 125  $\mu$ l o bien de proteína PAS(#1)200-IFNa2b, proteína PAS(#1)400-IFNa2b, proteína PAS(#1)600-IFNa2b, proteína PAS(#5)-IFNa2b o bien de proteína PAS(#5)384-IFNa2b con una concentración de 1 mg/ml en PBS que contenía EDTA 1 mM para lograr una dosis de 7 mg de proteína de prueba por kg de peso corporal (p.c.). Se tomaron muestras de sangre tras 30 min., 240 min., 360 min. y 480 min. Se sometieron a ensayo de forma cuantitativa muestras de plasma para determinar IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b o PAS(#1)400-IFNa2b usando un ELISA de tipo sándwich. Para estimar la vida media plasmática de PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b, se representaron gráficamente los valores de concentración obtenidos frente al tiempo tras la inyección intravenosa y se ajustaron de forma numérica suponiendo una disminución exponencial.

40 Como resultado, se retardó significativamente la fase de eliminación determinada para PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b, con vidas medias de  $66,2 \pm 5,6$  min.,  $316,1 \pm 76,8$  min., y aproximadamente  $406,8 \pm 60$  min., respectivamente, demostrando así una circulación prolongada de más de 10 veces, 60 veces y 70 veces debido a la fusión con el polímero de Pro-Ala-Ser con 200, 400 y 600 residuos, respectivamente, en comparación con el IFNa2b no fusionado (figura 9). De manera similar, se retardó significativamente la fase de eliminación determinada para PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b, con vidas medias de  $40,4 \pm 5,6$  min. y aproximadamente  $321 \pm 93,6$  min., respectivamente, demostrando así una circulación prolongada de más de 7 veces y 60 veces debido a la fusión con el polímero de Pro-Ala-Ser con 192 y 384 residuos, respectivamente, en comparación con el IFNa2b no fusionado (figura 9).

- 45 Figura 11: Farmacocinética de la NGAL recombinante purificada y sus fusiones con el polímero PAS#1 con 100 ó 200 residuos.

50 Ratas Wistar hembras con pesos corporales de aproximadamente 210 g recibieron inyecciones de aproximadamente 1050  $\mu$ l de o bien proteína NGAL, NGAL-PAS(#1)100 o bien NGAL-PAS(#1)200 con una concentración de 1 mg/ml en PBS para lograr una dosis de 5 mg de proteína de prueba por kg de peso corporal (p.c.). Se tomaron muestras de sangre tal como se indica. Se diluyeron 1:5 con PBS alícuotas de plasma aclarado. Se mezclaron tres alícuotas de 1,25  $\mu$ l de la muestra diluida (correspondientes a 0,25  $\mu$ l de plasma) de animales a los que se les inyectó, a cada uno, una de las tres

diferentes proteínas y se aplicaron a una SDS-PAGE al 12 % y se sometieron a inmunotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa. Se detectaron las proteínas recombinantes mediante la incubación con conjugado de fosfatasa alcalina-StrepTactin® (IBA, Göttingen, Alemania), que reconoce Strep-tag II, y se reveló en una reacción cromogénica.

5 Las figuras 11A y 11B representan dos series temporales con muestras de plasma independientes de diferentes animales del grupo A (inyección de NGAL), grupo B (inyección de NGAL-PAS(#1)100) y grupo C (inyección de NGAL-PAS(#1)200). Los carriles más a la izquierda en las figuras 11A y 11B muestran el patrón de tamaño molecular (con los tamaños de marcador a la izquierda), los siguientes carriles muestran mezclas de las tres muestras de plasmas que contienen NGAL, NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 en los puntos de tiempo indicados, y el carril más a la derecha muestra una mezcla de NGAL, NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 purificados (cada uno 0,1 µg) como referencia.

10 Las inmunotransferencias revelan las mayores señales para las tres muestras de proteína en el punto de tiempo más temprano, es decir, tras 5 min., con una disminución rápida de la NGAL, que ya no es detectable tras 30 min. En cambio, tanto NGAL-PAS(#1)100 como NGAL-PAS(#1)200 son detectables durante periodos mucho más largos, con un efecto ligeramente más intenso para la fusión de 200 residuos en comparación con la fusión de 100 residuos, lo que indica una circulación significativamente prolongada en comparación con la proteína NGAL no fusionada. Particularmente, no hubo ninguna indicación de degradación proteolítica para ninguna muestra de proteína. Por tanto, no sólo la proteína de interés NGAL sino también el resto de fusión con polímero revelan una alta estabilidad en suero. Finalmente, ninguno de los animales mostró ningún signo de toxicidad aguda o inflamación, lo que demuestra una alta tolerancia para las proteínas de fusión según esta invención.

Figura 12: Análisis cuantitativo de la farmacocinética de la NGAL recombinante purificada y su fusión con el polímero PAS#1 con 200 residuos.

25 Se sometieron a ensayo muestras de plasma de los mismos animales investigados en la figura 11A para determinar las concentraciones de NGAL o NGAL-PAS(#1)200 usando un ELISA de tipo sándwich. Por tanto, se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación con un anticuerpo anti-lipocalina-2/NGAL humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) como anticuerpo de captura y se aplicaron series de dilución de las muestras de plasma de animales del grupo A (inyección de NGAL) o grupo C (inyección de NGAL-PAS(#1)200). Se detectaron NGAL y NGAL-PAS(#1)200 unidos con el conjugado de fosfatasa alcalina-StrepTactin®, que reconoce Strep-tag II, seguido por la reacción cromogénica. Se cuantificaron las concentraciones de NGAL y NGAL-PAS(#1)200 mediante comparación con una curva patrón preparada con las proteínas recombinantes purificadas aplicadas a una concentración conocida. Para estimar la vida media plasmática de NGAL y NGAL-PAS(#1)200, se representaron gráficamente los valores de concentración experimentales frente al tiempo tras la inyección intravenosa y se ajustaron de forma numérica suponiendo una disminución monoexponencial, mediante lo cual para mejor claridad se representan sólo los puntos de datos hasta 360 min.

40 La proteína NGAL no fusionada presentó un aclaramiento muy rápido con una vida media de  $3,1 \pm 0,2$  min. Según los principios del escalamiento alométrico (Mahmood (2005) Interspecies Pharmacokinetic Scaling: Principles and Application of Allometric Scaling. Pine House Publishers, Rockville, Maryland) este valor concuerda con la vida media de 10 min. descrita para la forma monomérica de la NGAL natural en seres humanos (Axelsson (1995) Scand J Clin Lab Invest 55:577-588), lo que indica un mecanismo de captación celular que puede ser único para esta proteína particular. Recientemente, pudo mostrarse que la megalina, un elemento del receptor de lipoproteínas de baja densidad, puede actuar como un receptor para NGAL en las células epiteliales de riñón y mediar su captación (Hvidberg (2005) FEBS Lett 579:773-777).

45 En cambio, la fase de eliminación determinada para NGAL-PAS(#1)200 fue significativamente más lenta, con una vida media terminal de  $30,9 \pm 1,3$  min., demostrando así una circulación prolongada diez veces debido a la fusión con el polímero de Pro-Ala-Ser con 200 residuos en comparación con la NGAL no fusionada. El efecto retardante en la vida media plasmática puede ser incluso más pronunciado para una proteína de interés que no está sujeta a un mecanismo de aclaramiento específico tal como es obviamente el caso para NGAL.

Figura 13: Análisis comparativo del IntronA disponible comercialmente (Schering, Kenilworth, NJ), PAS(#1)200-IFNa2b recombinante y un fragmento Fab recombinante (que sirve como control negativo) mediante ELISA para IP-10. Se incubaron  $2 \times 10^5$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas con IntronA, PAS(#1)200-IFNa2b o un fragmento Fab, que se prepararon de manera similar a PAS(#1)200-IFNa2b, a diferentes concentraciones. La actividad específica de IntronA fue de  $2,6 \times 10^8$  U/mg según la hoja de datos del fabricante. Se cuantificó la proteína IP-10 inducida mediante el conjunto de ELISA para IP-10 humana (BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen, EE.UU.). IntronA y PAS(#1)200-IFNa2b inducen la liberación de IP-10 de una manera dependiente de la concentración con

efectos similares. Las PBMC no estimuladas así como las tratadas con el fragmento Fab no mostraron ninguna producción de IP-10 significativa.

Figura 14: Predicción teórica de la estructura secundaria para las secuencias de polímero de Pro-Ala-Ser y Ser-Ala según el método de Chou-Fasman (Chou y Fasman (1974) *Biochemistry* 13: 222-245). Esta ilustración muestra la salida del algoritmo informático CHOFAS tal como se implementó en el servidor de predicción de estructura secundaria y comparación de secuencias en la Universidad de Virginia (URL: [http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2)). Para evitar los efectos de borde en los extremos amino y carboxilo-terminal, se pegó cada bloque de secuencia de aminoácidos según la figura 1 en tres copias repetidas y sólo se consideró la salida para el bloque central (encuadrado). En el caso de la secuencia del polímero piSA (SEQ ID NO: 56) el algoritmo de Chou-Fasman predice una estructura secundaria de hélice  $\alpha$  para 20 de 20 residuos, es decir, el 100 %. Esto está en clara contraposición con la conformación de lámina  $\beta$  predominante observada de manera experimental para esta secuencia polimérica como parte de una proteína de fusión (véase la figura 6). En el caso de la secuencia del polímero PAS#1 (SEQ ID NO: 57), el algoritmo de Chou-Fasman predice una estructura secundaria de hélice  $\alpha$  para 12 de 20 residuos, es decir, el 60 %. Esto está en clara contraposición con una conformación de espiral al azar predominante observada de manera experimental para esta secuencia polimérica como parte de una proteína de fusión (véase la figura 6). En el caso de la secuencias del polímero PAS#5 (SEQ ID NO: 58), el algoritmo de Chou-Fasman predice una estructura secundaria de hélice  $\alpha$  para 20 de 24 residuos, es decir, el 83,3 %. De nuevo, esto están en clara contraposición con una conformación de espiral al azar predominante observada de manera experimental para esta secuencia polimérica como parte de una proteína de fusión (véase la figura 6).

### Ejemplos

Se describe adicionalmente la presente invención a modo de los siguientes ejemplos ilustrativos, no limitativos que proporcionan una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas.

A menos que se indique de otro modo, se usaron métodos establecidos de la tecnología génica recombinante tal como se describe, por ejemplo, en Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: Síntesis génica para polímeros de aminoácidos Pro-Ala-Ser y Ser-Ala.

Tal como se describió anteriormente, las repeticiones de aminoácidos que consisten en residuos de Pro, Ala y Ser se representan en el presente documento como "PAS" (también conocidos anteriormente como "APS"). Los fragmentos génicos que codifican para una secuencia de polímero repetitiva que comprende residuos de Pro, Ala y Ser (PAS#1 que corresponde a la SEQ ID NO: 18, PAS#2 que corresponde a la SEQ ID NO: 20, PAS#3 que corresponde a la SEQ ID NO: 22, PAS#5 que corresponde a la SEQ ID NO: 26 y PAS#1P2 que corresponde a la SEQ ID NO: 28) o Ser y Ala (piSA que corresponde a la SEQ ID NO: 2) se obtuvieron mediante hibridación y ligamiento de los dos oligodesoxinucleótidos complementarios mostrados en las figuras 1A-F usando una formación concatémica de manera dirigida, aprovechando sus extremos cohesivos no palindrómicos compatibles entre sí. Se adquirieron los oligodesoxinucleótidos de IBA (Göttingen, Alemania) y se purificaron mediante electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida con urea. Las secuencias de aminoácidos representadas en las SEQ ID NO 30, 32, 34, 36, 38 y 40 representan versiones de clonación de las SEQ ID NO 18, 20, 22, 26, 2 y 28, respectivamente, que comprenden una alanina adicional. De manera correspondiente, las secuencias de ácido nucleico representadas en las SEQ ID NO 29, 31, 33, 35, 37 y 39 (que codifican para los aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO 30, 32, 34, 36, 38 y 40) comprenden un codón cgg adicional para alanina, que se elimina tras ligamiento mediante los extremos cohesivos. Se realizó fosforilación enzimática, mezclando 200 pmol de ambos oligodesoxinucleótidos en 100  $\mu$ l de Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, ATP 1 mM e incubación durante 30 min. a 37°C en presencia de 10 u de polinucleótido cinasa (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Tras desnaturalización durante 10 min. a 80°C, se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente durante la noche para conseguir la hibridación. Entonces, se ligaron 50  $\mu$ l de esta disolución añadiendo 1 u de ADN ligasa de T4 (MBI Fermentas) y 10  $\mu$ l de Tris/HCl 100 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTT 20 mM, ATP 10 mM, y en algunos casos 5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, en un volumen total de 100  $\mu$ l e incubación durante 50 min. en hielo. Tras inactivación por calor durante 10 min. a 70°C, se separaron los productos de ligamiento mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en presencia de tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). Tras tinción con bromuro de etidio, se escindió la banda correspondiente al segmento génico ensamblado de 300 pb (piSA), 420 pb (PAS#1P2), 576 pb (PAS#5) y 600 pb (PAS#1, 2, 3) de longitud y se aisló por medio de extracción con fenol.

Ejemplo 2: Construcción de vectores de expresión para las proteínas de fusión PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#5 y PAS#1P2 de interferón  $\alpha$ -2b (IFNa2b)

Para la clonación del fragmento génico sintético que codifica para PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#1P2 y PAS#5 del

ejemplo 1, se empleó un derivado de pASK75 (Skerra, A. (1994) Gene 151:131-135), pASK-2xSapI, que alberga una secuencia de nucleótidos con dos sitios de restricción SapI en orientación complementaria inversa (figura 2A). Se cortó este vector con SapI, se desfosforiló con fosfatasa alcalina de gamba (USB, Cleveland, OH), y se ligó con el fragmento de ADN sintético (figura 2B). Los plásmidos intermedios resultantes se designaron como pPAS(#1)200, pPAS(#2)200, pPAS(#3)200, pPAS(#5)192 y pPAS(#1P2)140.

Tras la transformación de *E. coli* XL1-Blue (Bullock (1987) Biotechniques 5: 376-378), se prepararon los plásmidos y se confirmaron las secuencias de los insertos de ácidos nucleicos sintéticos clonados mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN bicatenario automatizada (analizador genético ABI-Prism™310, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania) usando el kit BigDye™ terminator así como cebadores de oligodesoxinucleótido que permiten la secuenciación desde ambos lados. El plásmido resultante que albergaba la secuencia polimérica de aproximadamente 200 residuos sirvió como vector intermedio, lo que permitió la subclonación adicional sencilla del inserto de secuencia polimérica.

Se amplificó el gen codificante para IFNa2b a partir del plásmido IRAMP995M1713Q (RZPD, Berlín, Alemania) que portaba el ADNc correspondiente usando los oligodesoxinucleótidos 5'-TCTGTGGGCGCCAGCTCTTCTGCCTGTGATCTGCCTCAAACCCAC (SEQ ID NO: 59) y 5'-GAACCAAGCTTATTTCCTTACTTCTTAAAC (SEQ ID NO: 60) como cebadores. El primer cebador contiene un sitio de restricción KasI en el extremo 5', seguido por un sitio de restricción SapI (subrayado), mientras que el segundo cebador contiene un sitio de restricción HindIII (subrayado). Se purificó el producto de amplificación y se digirió con KasI y HindIII y se ligó en consecuencia con el vector de corte pASK-IBA4 (IBA, Göttingen, Alemania). Tras la transformación de *E. coli* XL1-Blue, se prepararon los plásmidos y se confirmaron las secuencias de los insertos de ácidos nucleicos clonados mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN bicatenario automatizada. El plásmido que codificaba para IFNa2b como una fusión con Strep-tag II N-terminal se designó como pASK-IFNa2b (figura 2C).

Para la construcción de los plásmidos de expresión que codifican para IFNa2b como una fusión con PAS(#1)200, PAS(#1)400 y PAS(#1)600, se cortó pASK-IFNa2b con SapI, se desfosforiló con fosfatasa alcalina de gamba, y se ligó con un exceso del fragmento génico para el polímero de 200 residuos aislado del plásmido intermedio pPAS(#1)200 mediante digestión de restricción con SapI (figura 2D). Tras la transformación de *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron. (1985) Gene 33:103-119), se prepararon los plásmidos y se confirmaron los tamaños del inserto que codificaba para el polímero mediante análisis de restricción. Los plásmidos que codificaban para IFNa2b que portaban una secuencia polimérica de 200, 400 y 600 residuos, es decir PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b, se designaron como pASK-PAS(#1)200-IFNa2b (figura 2G), pASK-PAS(#1)400-IFNa2b y pASK-PAS(#1)600-IFNa2b, respectivamente. Se construyeron los plásmidos que codificaban para PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b, PAS(#1P2)140-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b de manera similar usando el casete génico correspondiente apropiado que codificaba para cada uno de las secuencias de polímeros de ácido nucleico.

Ejemplo 3: Construcción de vectores de expresión para las proteínas de fusión PAS#1 y PAS#5 de antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra)

Se amplificó el gen codificante para IL-1ra (Carter (1990) Nature 344:633-638) a partir del plásmido IRANp969G0350D6IL1RN (RZPD, Berlín, Alemania) con el ADNc clonado usando los oligodesoxinucleótidos 5'-ACGATCGGCGCCAGCTCTTCTGCCCGACCCTCTGGGAGAAAATCC (SEQ ID NO: 61) y 5'-CTGGGCAAGCTTACTCGTCCTCTGGAAGTAG (SEQ ID NO: 62) como cebadores. El primer cebador contiene un sitio de restricción KasI en el extremo 5', seguido por un sitio de restricción SapI (subrayado), mientras que el segundo cebador contiene un segundo sitio de restricción HindIII (subrayado). Se purificó el producto de amplificación y se digirió con KasI y HindIII y se ligó en consecuencia con el vector de corte pASK-IBA4 (IBA, Göttingen, Alemania). Tras la transformación de *E. coli* XL1-Blue, se prepararon los plásmidos y se confirmaron las secuencias de los insertos de ácidos nucleicos sintéticos clonados mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN bicatenario automatizada. El plásmido que codificaba para IL1ra con una fusión con Strep-tag II N-terminal se designó como pASK-IL1ra (figura 2E).

Para la construcción de plásmidos de expresión que codifican para IL-1ra como una fusión con las secuencias del polímero de aminoácidos PAS(#1)200, PAS(#1)400, PAS(#5)192 y PAS(#5)384, se cortó pASK-IL1ra con SapI, se desfosforiló con fosfatasa alcalina de gamba, y se ligó con un exceso del fragmento génico para el polímero PAS#1 de 200 residuos o para el polímero PAS#5 de 192 residuos, respectivamente, se aisló de los plásmidos intermedios correspondientes pPAS(#1)200 y pPAS(#5)192 mediante digestión de restricción con SapI (figura 2F). Tras la transformación de *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron. (1985) Gene 33:103-119), se prepararon los plásmidos y se determinaron los tamaños de las regiones que codifican para polímero, que se insertaron durante el ligamiento en una o varias copias repetidas, mediante análisis de restricción. Los plásmidos que codificaban para IL-1ra que portaban una secuencia del polímero PAS#1 de 200 ó 400 residuos, es decir PAS(#1)200-IL1ra o PAS(#1)400-IL1ra, y los plásmidos que portaban una secuencia del polímero PAS#5 de 192 ó 384 residuos, es decir PAS(#5)192-IL1ra o PAS(#5)384-IL1ra, se designaron como pASK-PAS(#1)200-IL1ra, pASK-PAS(#1)400-IL1ra, pASK-PAS(#5)192-IL1ra y pASK-PAS(#5)384-IL1ra, respectivamente.

Ejemplo 4: Construcción de vectores de expresión para las proteínas de fusión PAS#1 y piSA de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL).

Para la construcción de vectores de expresión para las proteínas de fusión PAS#1 y piSA de NGAL, se clonaron los fragmentos génicos sintéticos correspondientes del ejemplo 1 en un derivado de pASK75 (Skerra, A. (1994) Gene 151:131-135), que albergaba el ADNc para una variante de NGAL (Breustedt (2006) *loc. cit.*) fusionada con Strep-tag II C-terminal (Skerra, (2000) *Methods Enzymol* 326:271-304), que portaba un sitio de restricción *Eco*O1091 entremedias (figura 3A). Se cortó este vector, denominado pNGAL15-Eco, con *Eco*O1091, se desfosforiló con fosfatasa alcalina de gamba (USB, Cleveland, OH), y se ligó con el fragmento de ADN sintético que codificaba para PAS#1 o piSA (figura 3B).

Tras la transformación de *E. coli* XL1-Blue (Bullock (1987) *Biotechniques* 5: 376-378), se prepararon los plásmidos y se confirmaron las secuencias de los insertos de ácidos nucleicos sintéticos clonados mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN bicatenario automatizada (analizador genético ABI-Prism™310) usando el kit BigDyeT™ terminator así como los cebadores de oligonucleótido que permitieron la secuenciación desde ambos lados. Los plásmidos que codificaban para NGAL que portaban una secuencia de polímero de residuos de PAS(#1)100 y PAS(#1)200, es decir NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200, se denominaron pNGAL-PAS(#1)100 y pNGAL-PAS(#1)200 (figura 3C), respectivamente. El plásmido que codificaba para NGAL que portaba una secuencia de polímero de residuos de piSA100, NGAL-piSA100, se denominó pNGAL-piSA100.

Ejemplo 5: Producción bacteriana y purificación de proteínas de fusión entre IFNa2b y los polímeros PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#5 y PAS#1P2 codificados genéticamente.

Se produjeron IFNa2b (masa calculada: 20,9 kDa), PAS(#1)200-IFNa2b (masa calculada: 37,4 kDa), PAS(#1)400-IFNa2b (masa calculada: 54,0 kDa), PAS(#1)600-IFNa2b (masa calculada: 70,5 kDa), PAS(#5)192-IFNa2b (masa calculada: 36,7 kDa) y PAS(#5)384-IFNa2b (masa calculada: 52,6 kDa) en *E. coli* BL21 (Novagen, Madison, EE.UU.; Wood (1966) *J Mol Biol* 16:118-133) que albergaban los plásmidos de expresión correspondientes del ejemplo 2 junto con los plásmidos auxiliares de plegamiento pTUM4 (Schlappschy (2006) *Protein Eng. Des. Sel.* 20: 273-284) usando un fermentador de mesa de 8 l con un medio mineral con glucosa sintético complementado con ampicilina 100 mg/l y cloranfenicol 30 mg/l, siguiendo un procedimiento tal como se describe para la producción de fragmentos Fab recombinantes (Schiweck (1995) *Proteins* 23: 561-565.). Se indujo la expresión génica recombinante mediante la adición de anhidrotetraciclina 500 µg/l (Skerra (1994) *Gene* 151: 131-135) tan pronto como el cultivo alcanzó una  $DO_{550} = 20$ . Tras un periodo de inducción de 2,5 h, se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendieron durante 10 min. en tampón de fraccionamiento periplasmático enfriado en hielo (sacarosa 500 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 8,0; 2 ml por l y  $DO_{550}$ ). Tras añadir EDTA 15 mM y lisozima 250 µg/ml, se incubó la suspensión celular durante 20 min. en hielo, se centrifugó varias veces, y se recuperó el sobrenadante aclarado que contenía la proteína recombinante. Se purificaron las variantes de IFNa2b mediante Strep-tag II fusionada al extremo N-terminal (Skerra (2000) *Methods Enzymol* 326:271-304) y mediante filtración en gel usando una columna Superdex S75 o S200 HiLoad 16/60 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Se produjeron PAS(#2)200-IFNa2b (masa calculada: 37,4 kDa), PAS(#3)200-IFNa2b (masa calculada: 38,6 kDa) y PAS(#1P2)140-IFNa2b (masa calculada: 31,7 kDa), a 22°C en *E. coli* BL21 que albergaba los plásmidos de expresión correspondientes del ejemplo 2 junto con el plásmido auxiliar de plegamiento pTUM4 usando cultivos en matraces agitados con 2 l de medio LB que contenía ampicilina 100 mg/l y cloranfenicol 30 mg/l. Se realizó la inducción de la expresión de genes foráneos con anhidrotetraciclina a una  $DO_{550} = 0,5$  durante la noche (lo que normalmente dio como resultado una  $DO_{550}$  de aproximadamente de 1,0 en la recogida). Se realizó la extracción periplasmática en presencia de sacarosa 500 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 8,0 que contenía 50 µg de lisozima por ml tal como se describió (Breustedt (2005) *loc. cit.*) y seguido por purificación mediante Strep-tag II usando cromatografía de afinidad a estreptavidina (Skerra (2000) *loc. cit.*) con un tampón de alta salinidad (NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 8,0).

Para todas las proteínas IFNa2b recombinantes, se obtuvieron preparaciones de proteínas homogéneas (figuras 4A/B/C) con rendimientos de 0,15 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para IFNa2b, 0,1 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#1)200-IFNa2b, 0,06 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#1)400-IFNa2b, 0,04 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#1)600-IFNa2b, 0,05 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#2)200-IFNa2b, 0,05 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#3)200-IFNa2b, 0,08 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#5)192-IFNa2b, 0,04 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#5)384-IFNa2b y 0,05 mg L<sup>-1</sup> DO<sup>-1</sup> para PAS(#1P2)140-IFNa2b.

Para el ensayo de actividad *in vitro*, se eliminaron adicionalmente contaminaciones de endotoxinas en las preparaciones de proteínas. Por tanto, se sometieron a diálisis las proteínas purificadas tres veces frente a PBS (NaCl 115 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM, pH 7,4) y se aplicaron a una columna de Q Sepharose FF 16/200 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) usando un sistema Äkta Purifier 10 con un acumulador Superloop de 50 ml (Amersham Biosciences) y PBS como tampón de corrida. Se recogió la fracción no retenida que contenía la proteína recombinante y se concentró hasta aproximadamente 1,5 mg/ml mediante ultrafiltración usando dispositivos de filtro para centrifuga Amicon Ultra (MWCO de 30000; 15 ml; Millipore, Billerica, MA). Se realizó una etapa de eliminación de endotoxinas adicional usando columnas de afinidad EndoTrap® (Profos AG, Regensburg, Alemania) usando PBS como tampón de corrida. El contenido de endotoxinas era inferior a 1 UE/ml a una concentración de

proteína de 1 mg/ml tal como se determinó usando el kit Endosafe PTS (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Francia).

- 5 Se realizó SDS-PAGE usando un sistema de tampón Tris de alta molaridad (Fling y Gregerson (1986) Anal Biochem 155: 83-88). Se determinaron las concentraciones de proteínas según la absorción a 280 nm usando los coeficientes de extinción calculados (Gill y von Hippel (1989) Anal Biochem 182: 319-326) de  $23590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  tanto para IFNa2b como para sus diversas fusiones con polímeros según la invención ya que estas no contribuían a la absorción UV debido a la falta de ácidos aromáticos.

Ejemplo 6: Producción bacteriana y purificación de proteínas de fusión entre IL-1ra y los polímeros PAS#1 y PAS#5 codificados genéticamente.

- 10 Se produjeron IL-1ra (masa calculada: 19,8 kDa), PAS(#1)200-IL1ra (masa calculada: 35,3 kDa), PAS(#1)400-IL1ra (masa calculada: 51,9 kDa), PAS(#5)192-IL1ra (masa calculada: 34,6 kDa) y PAS(#5)384-IL1ra (masa calculada: 50,5 kDa) en *E. coli* BL21 que albergaba los plásmidos de expresión correspondientes del ejemplo 3 junto con el plásmido auxiliar de plegamiento pTUM4 a 22°C usando cultivos en matraces agitados con 2 l de medio LB que contenía ampicilina 100 mg/l y cloranfenicol 30 mg/l. Se realizó la inducción de la expresión de genes foráneos con anhidrotetraciclina a una  $\text{DO}_{550} = 0,5$  durante la noche (lo que dio como resultado normalmente una  $\text{DO}_{550}$  de aproximadamente 1,0 en la recogida). Se realizó la extracción periplasmática en presencia de sacarosa 500 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 8,0 que contenía 50 µg de lisozima por ml tal como se describió (Breustedt (2005) *loc. cit.*) y seguido por la purificación mediante Strep-tag II usando cromatografía de afinidad a estreptavidina (Skerra (2000) *loc. cit.*) con un tampón de alta salinidad (NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 8,0).
- 15
- 20 Para todas las proteínas IL-1ra recombinantes, se obtuvieron preparaciones de proteínas homogéneas (figura 4D) con rendimientos de  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para IL-1ra,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para PAS(#1)200-IL1ra,  $0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para PAS(#1)400-IL1ra,  $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para PAS(#5)192-IL1ra y  $0,04 \text{ mg L}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para PAS(#5)384-IL1ra.

Ejemplo 7: Producción bacteriana y purificación de proteínas de fusión entre NGAL y los polímeros PAS#1 y piSA codificados genéticamente.

- 25 Se produjo la NGAL (masa calculada: 21,5 kDa) en *E. coli* BL21 que albergaba el plásmido de expresión pNGAL15 usando un fermentador de mesa de 8 l esencialmente tal como se describió en el ejemplo 4. Se purificó NGAL mediante Strep-tag II fusionada al extremo C-terminal (Skerra (2000) Methods Enzymol 326:271-304).

- 30 Se produjeron NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 y NGAL-piSA 100 (masa calculadas: 29,8 kDa, 38,1 kDa y 29,4 kDa, respectivamente) a 22°C en *E. coli* BL21 que albergaba los plásmidos de expresión correspondientes del ejemplo 4 usando cultivos en matraces agitados con 2 l de medio LB que contenía ampicilina 100 mg/l. Se realizó la inducción de la expresión de genes foráneos con anhidrotetraciclina a una  $\text{DO}_{550} = 0,5$  durante la noche (lo que dio como resultado normalmente una  $\text{DO}_{550}$  de aproximadamente 1,8 en la recogida). Se realizó la extracción periplasmática en presencia de sacarosa 500 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 8,0 que contenía 50 µg de lisozima por ml tal como se describió (Breustedt (2005) J Biol Chem 280:484-493) y seguido por purificación mediante Strep-tag II usando cromatografía de afinidad a estreptavidina (Skerra (2000) *loc. cit.*) con un tampón de alta salinidad (NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 100 mM, pH 8,0).
- 35

- 40 Para NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200, se obtuvieron preparaciones de proteínas homogéneas tras la cromatografía de afinidad de una etapa (figura 4E) con rendimientos de  $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para NGAL,  $0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para NGAL-PAS(#1)100, y  $0,8 \text{ mg l}^{-1} \text{ DO}^{-1}$  para NGAL-PAS(#1)200. Se purificó adicionalmente NGAL-piSA100 mediante filtración en gel usando una columna Superdex S75 HR 10/300 GL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), que produjo  $0,01 \text{ mg l}^{-1} \text{ DO}^{-1}$ .

- 45 Para el estudio PK *in vivo* en ratas wistar hembra, se eliminaron adicionalmente contaminaciones de endotoxinas. Por tanto, se sometieron a diálisis las proteínas NGAL, NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 purificadas tres veces frente a PBS y se aplicaron a una columna de Q Sepharose FF 16/200 (Amersham Biosciences) usando un sistema Äkta Purifier 10 con un acumulador Superloop de 50 ml (Amersham Biosciences) y PBS como tampón de corrida. Se recogió la fracción no retenida que contenía la proteína recombinante y se concentró hasta aproximadamente 1,5 mg/ml mediante ultrafiltración usando dispositivos de filtro para centrifuga Amicon Ultra (MWCO 10000; 15 ml; Millipore, Billerica, MA). Se realizó una etapa de eliminación de endotoxinas adicional usando columnas de afinidad EndoTrap® (Profos AG, Regensburg, Alemania) usando PBS como tampón de corrida.
- 50 El contenido de endotoxinas final estuvo entre 5,17 y 21,9 UE/ml a una concentración de proteína de 1 mg/ml tal como se determinó usando el kit Endosafe PTS (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Francia).

Ejemplo 8: Medición del volumen hidrodinámico para las proteínas de fusión recombinantes entre IFNa2b y los polímeros PAS#1, PAS#2, PAS#3, PAS#5 o PAS#1P2 codificados genéticamente de diferente longitud mediante filtración en gel analítica.

- 55 Se llevó a cabo la cromatografía de permeación en gel en una columna Superdex S200 HR 10/300 GL (Amersham Biosciences) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. usando un sistema Äkta Purifier 10 (Amersham Biosciences) con

PBS (NaCl 115 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM, pH 7,4) como tampón de corrida. Se aplicaron individualmente muestras de 250 µl del IFNa2b purificado y sus fusiones con polímero PAS#1 con 200, 400 y 600 residuos, o polímeros PAS#2 y PAS#3 con 200 residuos, o fusiones con polímero PAS#5 con 192 y 384 residuos, o polímeros PAS#1P2 con 140 residuos que resultaron de la cromatografía de afinidad con Strep-tag II tal como se describió en el ejemplo 5, a una concentración de 0,25 mg/ml en PBS. Las seis proteínas eluyeron como picos homogéneos individuales tal como se muestra en las figuras 5A/B/D.

Para la calibración de la columna tal como se muestra en las figuras 5C/E, se aplicaron 250 µl de una mezcla de las siguientes proteínas globulares (Sigma, Deisenhofen, Alemania) en PBS: ARNasa A (0,2 mg/ml), anhidrasa carbónica (0,2 mg/ml), ovoalbúmina (0,5 mg/ml), albúmina sérica bovina (0,5 mg/ml), transferrina (0,2 mg/ml) y alcohol deshidrogenasa (0,4 mg/ml).

Como resultado, las proteínas de fusión con los polímeros PAS#1 con 200, 400 y 600 residuos y los polímeros PAS#5 con 192 y 384 residuos presentaron unos tamaños significativamente mayores que las proteínas globulares correspondientes con el mismo peso molecular. El aumento del tamaño para PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b fue de 8,4 veces, 16,5 veces y 24,9 veces, respectivamente, en comparación con la proteína IFNa2b no fusionada. En cambio, la masa real fue sólo 1,8 veces, 2,6 veces y 3,4 veces mayor. El aumento del tamaño para PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b fue de 7,7 veces y 13,3 veces, respectivamente, en comparación con la proteína IFNa2b no fusionada. En estos casos, la masa real fue sólo 1,8 veces y 2,5 veces mayor.

De manera similar, las proteínas de fusión con los polímeros PAS#2 y PAS#3 con 200 residuos presentaron unos tamaños significativamente mayores que las proteínas globulares correspondientes con el mismo peso molecular. El aumento del tamaño para PAS(#2)200-IFNa2b y PAS(#3)200-IFNa2b fue de 8 veces y 7 veces, respectivamente, en comparación con la proteína IFNa2b no fusionada. En cambio, la masa real fue en ambos casos sólo 1,8 veces mayor. La proteína de fusión con el polímero PAS#1P2 con 140 residuos presentó también un tamaño mayor que las proteínas globulares correspondientes con el mismo peso molecular. Sin embargo, el aumento del tamaño para PAS(#1P2)140-IFNa2b fue sólo de 3 veces en comparación con la proteína IFNa2b no fusionada, mediante lo cual la masa real fue sólo 1,5 veces mayor. Por tanto, el aumento del tamaño para PAS(#1P2)140-IFNa2b con un número reducido de residuos de prolina (14 en PAS(#1P2)140) fue menos pronunciado, lo que indicó una influencia importante del contenido de Pro en las propiedades de espiral al azar de las secuencias de polímeros de aminoácidos.

En general, estas observaciones indican claramente el efecto de un gran aumento del volumen hidrodinámico como ha de esperarse si las secuencias del polímero de Pro-Ala-Ser adoptan la conformación de espiral al azar (Squire (1981) *J Chromatogr A* 210:433-442).

Ejemplo 9: Medición del volumen hidrodinámico para las proteínas de fusión recombinantes entre IL-1ra y los polímeros PAS#1 y PAS#5 codificados genéticamente de diferente longitud mediante filtración en gel analítica.

Se llevó a cabo la cromatografía de permeación en gel en una columna Superdex S200 HR 10/300 GL (Amersham Biosciences) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. usando un sistema Äkta Purifier 10 (Amersham Biosciences) tal como se describió en el ejemplo 8. Las cinco proteínas eluyeron como picos homogéneos individuales tal como se muestra en la figura 5F.

Para la calibración de la columna tal como se muestra en la figura 5G, se aplicaron 250 µl de una mezcla de las siguientes proteínas globulares (Sigma, Deisenhofen, Alemania) en PBS: ARNasa A (0,2 mg/ml), anhidrasa carbónica (0,2 mg/ml), ovoalbúmina (0,5 mg/ml), albúmina sérica bovina (0,5 mg/ml), transferrina (0,2 mg/ml) y alcohol deshidrogenasa (0,4 mg/ml).

Como resultado, las proteínas de fusión con los polímeros PAS#1 con 200 y 400 residuos y los polímeros PAS#5 con 192 y 384 residuos presentaron unos tamaños significativamente mayores que las proteínas globulares correspondientes con el mismo peso molecular. El aumento del tamaño para PAS(#1)200-IL1ra y PAS(#1)400-IL1ra fue de 8 veces y 17 veces, respectivamente, en comparación con la proteínas IL-1ra no fusionada. En cambio, la masa real fue sólo 1,8 veces y 2,6 veces mayor. El aumento del tamaño para PAS(#5)192-IL1ra y PAS(#5)384-IL1ra fue de 7 veces y 15 veces, respectivamente, en comparación con la proteína IL-1ra no fusionada. En estos casos la masa real fue sólo 1,7 veces y 2,5 veces mayor.

De nuevo, estas observaciones indican claramente el efecto de un gran aumento del volumen hidrodinámico como ha de esperarse si las secuencias del polímero de Pro-Ala-Ser adoptan una conformación de espiral al azar (Squire (1981) *loc. cit.*).

Ejemplo 10: Medición del volumen hidrodinámico para las proteínas de fusión recombinantes entre NGAL y los polímeros PAS#1 y piSA codificados genéticamente mediante filtración en gel analítica.

Se llevó a cabo la cromatografía de permeación en gel en una columna Superdex S75 HR 10/300 GL o Superdex S200 HR 10/300 GL (Amersham Biosciences) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. usando un sistema Äkta

Purifier 10 (Amersham Biosciences) tal como se describió en el ejemplo 8. Las cuatro proteínas (NGAL, NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 y NGALpiSA100) eluyeron como picos homogéneos individuales tal como se muestra en la figura 5H.

5 Para la calibración de la columna tal como se muestra en la figura 5I, se aplicaron 250  $\mu$ l de una mezcla de las siguientes proteínas globulares (Sigma, Deisenhofen, Alemania) en PBS:

aprotinina (0,5 mg/ml), ribonucleasa (0,4 mg/ml), mioglobina (0,2 mg/ml), anhidrasa carbónica (0,2 mg/ml), ovoalbúmina (0,5 mg/ml), albúmina sérica bovina (0,5 mg/ml) y transferrina (0,2 mg/ml) para la ejecución en Superdex S75 10/300 GL;

10 citocromo c (0,2 mg/ml), anhidrasa carbónica (0,2 mg/ml), ovoalbúmina (0,5 mg/ml), albúmina sérica bovina (0,5 mg/ml), transferrina (0,2 mg/ml) y alcohol deshidrogenasa (0,4 mg/ml) para la ejecución en Superdex S200 10/300 GL.

15 Como resultado, la proteína de fusión con el polímero PAS#1 con 100 residuos e, incluso más pronunciado, la versión con 200 residuos mostraron unos tamaños significativamente mayores que las proteínas globulares correspondientes con el mismo peso molecular. El aumento del tamaño para NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 fue de 3,4 veces y 4,9 veces, respectivamente, en comparación con la proteína NGAL no fusionada. La masa real fue sólo 1,4 veces y 1,8 veces mayor, respectivamente. Esta observación indica claramente el efecto de un volumen hidrodinámico mayor como ha de esperarse si la secuencia del polímero de Pro-Ala-Ser adopta la conformación de espiral al azar (Squire (1981) *J Chromatogr A* 210:433-442).

20 En cambio, la proteína de fusión con el polímero piSA con 100 residuos mostró un aumento del tamaño menos significativo en comparación con las proteínas globulares correspondientes que tienen el mismo peso molecular. El aumento del tamaño para NGAL-piSA100 fue sólo de 2,5 veces en comparación con la proteína NGAL no fusionada mediante lo cual la masa real fue 1,4 veces mayor. Por tanto, la fusión con el polímero de Pro-Ala-Ser de 100 residuos conduce a un aumento significativamente mayor en el volumen hidrodinámico que el polímero de Ala-Ser de 100 residuos.

25 Ejemplo 11: Detección de la conformación de espiral al azar para el polímero PAS#1 codificado genéticamente fusionado a IFNa2b mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

30 Se analizó la estructura secundaria usando un espectropolarímetro J-810 (Jasco, Groß-Umstadt, Alemania) equipado con una cubeta de cuarzo 106-QS (camino óptico de 0,1 mm; Hellma, Müllheim, Alemania). Se registraron espectros desde 190 hasta 250 nm a temperatura ambiente acumulando 16 ó 32 ejecuciones (ancho de banda de 1 nm, velocidad de barrido de 100 nm/min., respuesta de 4 s) usando disoluciones de proteínas de 15,9 a 38,7  $\mu$ M en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, fosfato de K 20 mM, pH 7,5. Tras la corrección para los blancos de disolución, se suavizaron los espectros usando el software del instrumento, y se calculó la elipticidad molar  $\Theta_M$  según la ecuación:

$$\Theta_M = \frac{\Theta_{obs}}{c \cdot d}$$

35 mediante lo cual  $\Theta_{obs}$  indica la elipticidad medida, c la concentración de proteína [mol/l], d el camino óptico de la cubeta de cuarzo [cm]. Se representaron gráficamente los valores de  $\Theta_M$  frente a la longitud de onda usando el programa Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA). El espectro de dicroísmo circular (DC) para el IFNa2b recombinantes concuerda con los datos publicados previamente para esta proteína de haz de hélices  $\alpha$  (Radhakrishnan (1996) *Structure* 4:1453-1463), mientras que los espectros para PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b revelan contribuciones significativas de la conformación de espiral al azar (figura 6A).  
40 Para analizar en mayor detalle las contribuciones espectroscópicas por la pareja de fusión de polímero, se calcularon los espectros de DC de diferencia molar con respecto al IFNa2b no fusionado (figura 6B). Como resultado, se observó un mínimo intenso aproximadamente a 200 nm, con una amplitud creciente desde 100 hasta 200 residuos, que es característico de la conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*). Por tanto, la secuencia Pro-Ala-Ser como parte de la proteína de fusión recombinante parece estar presente como un polímero de espiral al azar en condiciones también fisiológicas.

45 Ejemplo 12: Detección de la conformación de espiral al azar para el polímero PAS#5 codificado genéticamente fusionado a IFNa2b mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

50 Se analizó la estructura secundaria mediante DC tal como se describió en el ejemplo 11 usando disoluciones de proteínas de 2,3 a 5,1  $\mu$ M. Los espectros para PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b revelan contribuciones significativas de la conformación de espiral al azar (figura 6E). Para analizar en mayor detalle las contribuciones espectroscópicas por la pareja de fusión de polímero, se calcularon los espectros de DC de diferencia molar con respecto al IFN $\alpha$ -2b no fusionado (figura 6F). Como resultado, se observó un mínimo intenso aproximadamente a 200 nm característico de la conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*). Por tanto, la secuencia Pro-Ala-Ser como parte de la proteína de fusión recombinante

parece estar presente como un polímero de espiral al azar en condiciones tampón fisiológicas.

Ejemplo 13: Detección de la conformación de espiral al azar para el polímero PAS#2, PAS#3 y PAS#1P2 codificado genéticamente fusionado a IFNa2b mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

5 Se analizó la estructura secundaria mediante DC tal como se describió en el ejemplo 11 usando disoluciones de proteínas de 16,1 a 22,9  $\mu\text{M}$ . Los espectros para PAS(#2)200-IFNa2b, PAS(#3)200-IFNa2b y PAS(#1P2)140-IFNa2b revelan contribuciones significativas de la conformación de espiral al azar (figura 6C). Para analizar en mayor detalle las contribuciones espectroscópicas por la pareja de fusión de polímero, se calcularon los espectros de DC de diferencia molar con respecto al IFNa2b no fusionado (figura 6D). Como resultado, se observó un mínimo aproximadamente a 200 nm característico de la conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*;  
10 Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*). Por tanto, la secuencia Pro-Ala-Ser como parte de la proteína de fusión recombinante parece estar presente como un polímero de espiral al azar en condiciones tampón fisiológicas. Sin embargo, en el caso del polímero PAS#1P2 con un número reducido de residuos de prolina, la señal de DC para la espiral al azar se reduce significativamente, lo que indica una dependencia del carácter de espiral al azar con el contenido en Pro en las secuencias de polímeros de aminoácidos.

15 Ejemplo 14: Detección de la conformación de espiral al azar para el polímero PAS#1 y PAS#5 codificado genéticamente fusionado a IL-1ra mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

Se analizó la estructura secundaria mediante DC tal como se describió en el ejemplo 11 usando disoluciones de proteínas de 0,9 a 3,3  $\mu\text{M}$ . El espectro de dicroísmo circular (DC) para el IL-1ra recombinante concuerda con la estructura cristalina para esta proteína predominantemente de lámina  $\beta$  (Schreuder (1997) *Nature* 386:194-200),  
20 mientras que los espectros para PAS(#1)200-IL1ra, PAS(#1)400-IL1ra, PAS(#5)192-IL1ra y PAS(#5)384-IL1ra revelan una fracción significativa de la conformación de espiral al azar (figura 6G). Para analizar en mayor detalle las contribuciones espectroscópicas mediante la pareja de fusión de polímero, se calcularon los espectros de DC de diferencia molar con respecto al IL-1ra no fusionado (figura 6H). Como resultado, se observó un mínimo intenso aproximadamente a 200 nm característico de la conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*;  
25 Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*). Por tanto, la secuencia Pro-Ala-Ser como parte de la proteína de fusión recombinante con IL-1ra parece estar presente como un polímero de espiral al azar en condiciones tampón fisiológicas.

Ejemplo 15: Detección de la conformación de espiral al azar para el polímero PAS#1 codificado genéticamente fusionado a NGAL mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

30 Se analizó la estructura secundaria mediante DC tal como se describió en el ejemplo 11 usando disoluciones de proteínas de 23 a 28  $\mu\text{M}$ . El espectro de DC para NGAL recombinante concuerda con los datos publicados previamente (Breustedt (2006) *loc. cit.*), mientras que los espectros para NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 revelan contribuciones significativas de la conformación de espiral al azar (figura 6I). Para analizar en mayor detalle las contribuciones espectroscópicas por la pareja de fusión de polímero, se calcularon los espectros de DC de diferencia molar con respecto a la NGAL no fusionada (figura 6J). Como resultado, se observó un mínimo intenso aproximadamente a 200 nm característico de la conformación de espiral al azar (Greenfield (1969) *loc. cit.*;  
35 Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*). Por tanto, la secuencia Pro-Ala-Ser como parte de la proteína de fusión recombinante parece estar presente como un polímero de espiral al azar en condiciones tampón fisiológicas.

40 Ejemplo 16: Detección de la conformación de lámina  $\beta$  para el polímero piSA codificado genéticamente fusionado a NGAL mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

Se analizó la estructura secundaria tal como se describió en el ejemplo 11 usando una disolución de proteína 5  $\mu\text{M}$ . El espectro para NGAL-piSA100 revela un contenido significativo de la conformación de lámina  $\beta$  (figura 6K). Para analizar en mayor detalle las contribuciones espectroscópicas por la pareja de fusión de polímero, se calcularon los espectros de DC de diferencia molar con respecto a NGAL no fusionada (figura 6K). Como resultado, se observó un  
45 mínimo intenso a 218 nm característico de la conformación de lámina  $\beta$  (Greenfield (1969) *loc. cit.*; Sreerama (2000) *loc. cit.*; Fändrich (2002) *loc. cit.*). Por tanto, la secuencia del polímero de Ala-Ser como parte de la proteína de fusión recombinante parece adoptar predominantemente una estructura secundaria de lámina  $\beta$  compacta en condiciones tampón fisiológicas.

Ejemplo 17: Análisis cuantitativo de la estructura secundaria de IFNa2b, NGAL y sus fusiones con polímeros

50 Se cuantificó la estructura secundaria de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b, PAS(#5)384-IFNa2b, NGAL, NGAL-PAS(#1)100, NGAL-PAS(#1)200 y NGAL-piSA100 a partir de los espectros de DC correspondientes medidos en los ejemplos 11, 12, 15 y 16 usando el programa de deconvolución de estructura secundaria CDNN ver. 2.1 (Böhm (1992) *Prot Eng* 5:191-195) con un conjunto de 33 espectros de base para la deconvolución de los espectros de DC complejos. En la siguiente tabla se proporcionan  
55 los resultados obtenidos usando dicho programa de deconvolución CDNN:

	IFNa2b	PAS(#1)- 100- IFNa2b	PAS(#1)- 400- IFNa2b	PAS(#1)- 600- IFNa2b	PAS(#5)- 192- IFNa2b	PAS(#5)- 384- IFNa2b	NGAL	NGAL- PAS(#1)- 100	NGAL- PAS(#1)- 200	NGAL- piSA100
Hélice $\alpha$	38,2 %	17,6 %	10,0 %	8,1 %	19,1 %	10,5 %	7,2 %	5,9 %	6,1 %	8,4 %
Lámina $\beta$ antiparalela	1,8 %	11,6 %	11,7 %	7,9 %	9,0 %	9,9 %	38,3 %	22,6 %	27,2 %	50,0 %
Lámina $\alpha$ paralela	8,4 %	3,6 %	2,5 %	2,0 %	3,3 %	2,4 %	3,6 %	2,7 %	2,9 %	4,4 %
Giro $\beta$	19,2 %	35,6 %	36,5 %	40,0 %	41,4 %	40,8 %	18,5 %	23,7 %	22,3 %	15,6 %
Espiral al azar	35,9 %	42,0 %	46,8 %	52,6 %	43,5 %	48,1 %	33,3 %	42,2 %	39,1 %	28,2 %
$\Sigma$ total	103,5 %	110,4 %	107,4 %	110,7 %	116,4 %	111,7 %	100,8 %	97,0 %	97,6 %	106,6 %
$\Sigma$ giro $\beta$ y espiral al azar	55,1 %	77,6 %	83,3 %	92,6 %	84,5 %	88,9 %	51,8 %	65,9 %	61,4 %	43,8 %

En comparación con el contenido de estructura secundaria predominantemente de hélice  $\alpha$  del IFNa2b recombinante, que concuerda con su estructura tridimensional conocida como una proteína de haz de hélices  $\alpha$  (Radhakrishnan (1996) *loc. cit.*), la fracción de conformación no estructurada que comprende la espiral al azar y los giros para la proteína completa aumenta claramente con la longitud de los polímeros PAS(#1) y PAS(#5) fusionados a IFNa2b (véase la fila de la parte inferior de la tabla mostrada anteriormente, que resume los resultados de la deconvolución de espectros de DC con el programa CDNN). Un efecto generalmente similar pero menos pronunciado puede observarse para NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200. Estos datos espectroscópicos concuerdan con los volúmenes hidrodinámicos ampliados determinados de manera experimental de las proteínas de fusión de PAS(#1) y PAS(#5) de IFNa2b y NGAL tal como se determinó en los ejemplos 8 y 10, lo que ha de esperarse para una conformación de espiral al azar no estructurada (Cantor (1980) *loc. cit.*; Creighton (1993) *loc. cit.*).

En cambio, en el caso de la proteína de fusión NGAL-piSA100 la cantidad de giros y de espiral al azar es incluso menor que en la NGAL recombinante, mientras que la cantidad de lámina  $\beta$  antiparalela aumenta desde el 38,3 % en NGAL hasta el 50,0 % en NGAL-piSA100. Por tanto, el polímero piSA100 que comprende sólo residuos de Ser y Ala adopta una estructura de lámina  $\beta$  en vez de una espiral al azar, que se refleja por el aumento menos significativo en el volumen hidrodinámico tal como se midió en el ejemplo 10.

Se obtuvieron diferentes resultados cuando se realizó un análisis teórico de las secuencias del polímero PAS#1, PAS#5 y piSA usando el algoritmo de Chou-Fasman (Chou y Fasman (1974) *loc. cit.*). Los resultados de este análisis se ilustran en la figura 14. A pesar de la composición de aminoácidos y la secuencia del polímero de aminoácidos, este algoritmo predice una estructura secundaria de hélice  $\alpha$  en más del 50 %, lo que está en clara contraposición con los datos experimentales. Por tanto, este algoritmo no es útil para predecir una conformación no estructurada de un polímero de aminoácidos con confianza.

#### Ejemplo 18: Prueba de estabilidad en suero de PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#5)192-IFNa2b

Se analizó la estabilidad en suero de PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#5)192-IFNa2b mezclando 10  $\mu$ l de proteína de prueba a una concentración de 1 mg/ml y 50  $\mu$ l de plasma de ratón (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA), lo que dio como resultado una concentración de proteína de prueba de 0,17 mg/ml y una concentración de plasma del 83 % (v/v). Se incubaron las muestras a 37°C durante 24 h o 48 h. Se tomaron muestras (6  $\mu$ l) a 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h y 24 h en el caso de PAS(#5)192-IFNa2b y a 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 24 h, 32 h y 48 h en el caso de PAS(#1)200-IFNa2b, y se diluyeron inmediatamente con 54  $\mu$ l de tampón de electroforesis de SDS-PAGE (Tris/HCl 50 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 1 g/l) y 15  $\mu$ l de tampón de carga de SDS-PAGE (Tris/HCl 250 mM, pH 8,0, glicerina al 25 % (v/v), SDS al 7,5 % (p/v), azul de bromofenol 0,25 mg/ml,  $\beta$ -mercaptoetanol al 12,5 % (v/v)). Tras calentamiento durante 5 min. a 95°C, se sometieron 25  $\mu$ l de estas muestras y una muestra de referencia (0,1  $\mu$ g de la proteína de prueba correspondiente) a SDS-PAGE al 12 %. Tras la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) por medio de un aparato de inmunotransferencia semiseco, se colocó la membrana en una placa y se lavó 3 veces durante 20 min. con 10 ml de PBST (PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % v/v). Se incubó la membrana durante 10 min. en 20 ml de PBST que contenía avidina de clara de huevo 2  $\mu$ g/ml para enmascarar los grupos de biotina unidos a proteínas endógenas y entonces se añadieron directamente 20  $\mu$ l de conjugado de fosfatasa alcalina-StrepTactin® (IBA, Göttingen, Alemania) (a una dilución de 1:1000). Tras la incubación durante 1 h y lavado de la membrana dos veces durante 5 min. con 20 ml de PBST y PBS y una vez durante 5 min. con 20 ml de tampón AP (Tris/HCl 100 mM, pH 8,8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), se realizó la reacción cromogénica (sin agitación) añadiendo 10 ml de tampón AP con 5  $\mu$ l de azul de nitrotetrazolio (NBT, Biomol, Hamburgo, Alemania; 75 mg/ml en DMF al 70 % p/v) y 30  $\mu$ l de sal de p-toluidina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, Roth, Karlsruhe, Alemania; 50 mg/ml en DMF) hasta que aparecieron las bandas. Se detuvo la reacción mediante lavado con agua y secado al aire de la membrana.

Para ambas proteínas de prueba, las inmunotransferencias revelan señales de intensidad constante para todos los puntos de tiempo (figuras 7A/B). Tampoco, pudo detectarse ningún producto de degradación. Por tanto, no existe ninguna degradación proteolítica o signo de agregación, que conduciría a una disminución de la proteína de prueba dentro del periodo de tiempo investigado de 24 h para PAS(#5)192-IFNa2b y 48 h para PAS(#1)200-IFNa2b.

Ejemplo 19: Detección de la vida media plasmática prolongada para las proteínas de fusión recombinantes entre IFNa2b y un polímero PAS#1 codificado genéticamente *in vivo*.

Se inyectó a ratones BALB/c adultos (Harlan-Winkelmann, Borchon, Alemania) por vía intravenosa según la siguiente tabla:

Grupo	A	B	C
Artículo de prueba	IFNa2b	PAS(#1)200-IFNa2b	PAS(#1)400-IFNa2b
Vía de administración	Intravenosa		
Dosis [mg/kg p.c.]	5,0	5,0	5,0
Concentración [mg/ml]	1,0	1,0	1,0

Volumen de aplicación [ml/kg p.c.]	5,0		
N.º de animales/grupo	2	2	2
N.º de puntos de tiempo de toma de muestras de sangre	3	3	3
N.º de animales/punto de tiempo de toma de muestras	1	1	1
N.º de tomas de muestras de sangre/animal	2/1	2/1	2/1

Se calculó el volumen total del artículo de prueba administrado por vía intravenosa según el peso corporal individual registrado en el día de la administración (por ejemplo, un animal con 25 g de peso corporal (p.c.) recibió 125 µl de artículo de prueba de 1 mg/ml). Se realizó la toma de muestras de sangre 30 min., 120 min. y 360 min. tras la inyección según la siguiente tabla:

Grupo	Artículo de prueba	N.º de animales	Puntos de tiempo de toma de muestras de sangre (min. tras la administración)		
			30	120	360
A	IFNa2b	1	x		x
		2		x	
B	PAS(#1)200-IFNa2b	3	x		x
		4		x	
C	PAS(#1)400-IFNa2b	5	x		x
		6		x	

5 Para cada sustancia, se inyectó a dos animales de un grupo. Se tomaron muestras de sangre (aproximadamente de 100 µl cada una) de la vena de la cola y se almacenaron en hielo triturado durante aproximadamente 20 min. Tras la centrifugación durante 10 min. a 10000 g y 4°C, se congeló inmediatamente el sobrenadante (plasma) y se almacenó a -20°C.

10 Para la detección cualitativa de la proteína de fusión en una inmunotransferencia de tipo Western, se diluyeron alícuotas de 10 µl de las muestras de plasma aclaradas con 90 µl de PBS. Se diluyeron 10 µl de las mismas (correspondientes a 1 µl de plasma) con 6 µl de PBS y se mezclaron con 4 µl de tampón de carga de SDS-PAGE (Tris/HCl 250 mM, pH 8, SDS al 7,5 % p/v, glicerol al 25 % v/v, azul de bromofenol 0,25 mg/ml) que contenía 2-mercaptoetanol al 12,5 % v/v. Tras calentar durante 5 min. a 95°C, se sometieron estas muestras a SDS-PAGE al 10 %. Tras la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) por medio de un aparato de inmunotransferencia semiseco, se colocó la membrana en una placa y se lavó 3 veces durante 20 min. con 10 ml de PBST (PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % v/v). Entonces, se incubó la membrana durante 10 min. en 20 ml de PBST que contenía 20 µl del anticuerpo de ratón anti-IFNa2b humano 9D3 (Abcam, Cambridge, R.U.; a una dilución de 1:1000). Tras una incubación adicional durante 60 min. se lavó la membrana 3 veces con 10 ml de PBST y entonces se incubó con un conjugado de anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 60 min.

25 Tras lavar la membrana dos veces durante 5 min. con 20 ml de PBST y una vez durante 5 min. con 20 ml de tampón AP (Tris/HCl 100 mM, pH 8,8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), se realizó la reacción cromogénica (sin agitación) añadiendo 10 ml de tampón AP con 5 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT, Biomol, Hamburgo, Alemania; 75 mg/ml en DMF al 70 % p/v) y 30 µl de sal de p-toluidina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, Roth, Karlsruhe, Alemania; 50 mg/ml en DMF) hasta que aparecieron las bandas. Se detuvo la reacción mediante lavado con agua y secado al aire de la membrana.

30 La figura 8 presenta muestras que contienen IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b de puntos de tiempo equivalentes. Aunque IFNa2b ya no es detectable después de 120 min., PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b pueden detectarse durante periodos de hasta 360 min. Estos datos indican que la vida media plasmática de IFNa2b se prolonga significativamente cuando se fusiona con los polímeros de Pro-Ala-Ser.

35 Para la detección cuantitativa de la proteína de fusión en un ELISA, se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb, NUNC, Dinamarca) durante la noche a 4°C con 100 µl de una disolución 5 µg/ml del anticuerpo de ratón anti-IFNa2b humano 9D3 (Abcam, Cambridge, R.U.) en NaHCO<sub>3</sub> al 5 % (p/v), pH 9,3. Tras la retirada de la disolución de recubrimiento, se bloquearon los pocillos con 200 µl de BSA al 2 % (p/v) en PBS durante 1 h y se lavaron tres veces con PBST. Se aplicaron las muestras de plasma de los animales n.º 1/2 (IFNa2b), n.º 3/4 (PAS(#1)200-IFNa2b) y n.º 5/6 (PAS(#1)400-IFNa2b) en series de dilución con PBST que contenía plasma de ratón al 0,5 % (v/v) de un animal no tratado y se incubaron durante 1 h. Entonces se lavaron los pocillos tres veces con PBST y se incubaron durante 1 h con 100 µl de una disolución diluida 1:1000 de un segundo conjugado de anticuerpo de ratón anti-IFNa2b humano-HRP (4E10-HRP; Abcam, Cambridge, R.U.) en PBST. Tras lavar dos veces con PBST y dos veces con PBS, se inició la reacción cromogénica añadiendo 100 µl de disolución

de ABTS 1 mg/ml en tampón ABTS (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) como sustrato para la peroxidasa y tras 20 min. a 25°C se midió la absorbancia a 405 nm. Se cuantificaron las concentraciones de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b en las muestras de plasma mediante comparación con curvas patrón que se determinaron para las series de dilución para las proteínas recombinantes purificadas correspondientes a concentraciones definidas en PBST que contenía plasma de ratón al 0,5 % (v/v) de animales no tratados.

Para determinar la vida media plasmática de IFNa2b, PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b, se determinaron los valores de la concentración,  $c(t)$ , para cada punto de tiempo a partir de las mediciones de ELISA y se representaron gráficamente frente al tiempo tras la inyección intravenosa,  $t$ . Se ajustaron estos datos de forma numérica usando el software KaleidaGraph que supone una disminución monoexponencial según la ecuación

$$c(t) = c_0 e^{-\ln 2 \frac{t}{\tau_{1/2}}}$$

mediante lo cual  $\tau_{1/2}$  es la vida media plasmática, y  $c_0$  es la concentración sanguínea total en el punto de tiempo cero, que se estableció para un valor fijo de 78 µg/ml con la suposición de un peso de animal promedio de 25 g y una razón de sangre con respecto a peso corporal típica para el ratón de 0,064.

La figura 9 representa la cinética de aclaramiento en sangre *in vivo*. Aunque el IFNa2b recombinante muestra un aclaramiento rápido de la sangre con una vida media de sólo aproximadamente 5,5 min., las proteínas de fusión PAS(#1)200-IFNa2b y PAS(#1)400-IFNa2b tienen una vida media ampliada en más de 10 veces y 60 veces de aproximadamente 61 min. y 6 h, respectivamente. Estos datos concuerdan con el análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostrado anteriormente y demuestran que la vida media plasmática *in vivo* de IFNa2b se prolonga significativamente debido a la fusión con los polímeros de Pro-Ala-Ser, mediante lo cual la vida media se vuelve más larga con una longitud creciente del polímero de aminoácidos.

Ejemplo 20: Detección de la vida media plasmática prolongada para las proteínas de fusión recombinantes entre IFNa2b y los polímeros PAS#1 y PAS#5 codificados genéticamente *in vivo*.

Se inyectó por vía intravenosa a ratones C57BL/6 adultos (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Francia) según la siguiente tabla:

Grupo	A	B	C	D	E
Artículo de prueba	PAS(#1)200-IFNa2b	PAS(#1)400-IFNa2b	PAS(#1)600-IFNa2b	PAS(#5)192-IFNa2b	PAS(#5)384-IFNa2b
Vía de administración	Intravenosa				
Dosis [mg/kg p.c.]	7,0				
Concentración [mg/ml]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volumen de aplicación [ml/kg p.c.]	7,0				
N.º de animales/ grupo	2	2	2	2	2
N.º de puntos de tiempo de toma de muestras de sangre	4	4	4	4	4
N.º de animales/punto de tiempo de toma de muestras	1	1	1	1	1
N.º de tomas de muestras de sangre/animal	2	2	2	2	2

Se calculó el volumen total del artículo de prueba administrado por vía intravenosa según el peso corporal individual registrado en el día de la administración (por ejemplo, un animal con 18 g de peso corporal (c.p.) recibió 125 µl de artículo de prueba de 1 mg/ml). Se realizó la toma de muestras de sangre 30 min., 120 min., 240 min. y 480 min. tras la inyección según la siguiente tabla:

Grupo	Artículo de prueba	N.º animal	Puntos de tiempo de toma de muestras de sangre (min. tras la administración)			
			30	120	240	480
A	PAS(#1)200-IFNa2b	1	x		x	
		2		x		x
B	PAS(#1)400-IFNa2b	3	x		x	
		4		x		x
C	PAS(#1)600-IFNa2b	5	x		x	
		6		x		x
D	PAS(#5)192-IFNa2b	7	x		x	
		8		x		x
E	PAS(#5)384-IFNa2b	9	x		x	

		10		x		x
--	--	----	--	---	--	---

Para cada sustancia, se inyectó a dos animales de un grupo. Se tomaron muestras de sangre (aproximadamente de 100 µl cada una) de la vena de la cola y se almacenaron en hielo triturado durante aproximadamente 20 min. Tras la centrifugación durante 10 min. a 10000 g y 4°C, y se congeló inmediatamente el sobrenadante (plasma) y se almacenó a -20°C.

- 5 Para la detección cuantitativa de la proteína de fusión en un ELISA, se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb, NUNC, Alemania) durante la noche a 4°C con 100 µl de una disolución 5 µg/ml del anticuerpo de ratón anti-IFNa2b humano 9D3 (Abcam, Cambridge, R.U.) en NaHCO<sub>3</sub> al 5 % (p/v), pH 9,3. Tras la retirada de la disolución de recubrimiento, se bloquearon los pocillos con 200 µl de BSA al 2 % (p/v) en PBS durante 1 h y se lavaron tres veces con PBST. Se aplicaron las muestras de plasma de los animales n.º 1/2
- 10 (PAS(#1)200-IFNa2b), n.º 3/4 (PAS(#1)400-IFNa2b), n.º 5/6 (PAS(#1)600-IFNa2b), n.º 7/8 (PAS(#5)192-IFNa2b) y n.º 9/10 (PAS(#5)384-IFNa2b) en series de dilución con PBST que contenía plasma de ratón de simulación al 0,25 % (v/v) (de un animal no tratado) y se incubaron durante 1 h. Entonces se lavaron los pocillos tres veces con PBST y se incubaron durante 1 h con 100 µl de una disolución diluida 1:1000 de un segundo conjugado de anticuerpo de ratón anti-IFNa2b humano-HRP (4E10-HRP; Abcam, Cambridge, R.U.) en PBST. Tras lavar dos veces con PBST y
- 15 dos veces con PBS, se inició la reacción cromogénica añadiendo 100 µl de disolución de sustrato de peroxidasas ABTS 1 mg/ml en el tampón recomendado (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y, tras la incubación durante 20 min. a 25°C, se midió la absorbancia a 405 nm. Se cuantificaron las concentraciones de PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b en las muestras de plasma mediante la comparación con curvas patrón, que se determinaron para series de dilución para las proteínas recombinantes purificadas correspondientes a concentraciones definidas en PBST que contenía plasma de ratón de simulación al 0,25 % (v/v).

Para estimar la vida media plasmática de PAS(#1)200-IFNa2b, PAS(#1)400-IFNa2b, PAS(#1)600-IFNa2b, PAS(#5)384-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b, se determinaron los valores de concentración, c(t), para cada punto de tiempo a partir de las mediciones de ELISA y se representaron gráficamente frente al tiempo tras la inyección intravenosa, t.

25 Se ajustaron estos datos de forma numérica usando el software KaleidaGraph que supone una disminución monoexponencial según la ecuación

$$c(t) = c_0 e^{-\frac{\ln 2 \cdot t}{\tau_{1/2}}}$$

mediante lo cual  $\tau_{1/2}$  es la vida media plasmática, y  $C_0$  es la concentración sanguínea total en el punto de tiempo cero, que debe tener un valor de aproximadamente 116 µg/ml con la suposición de un peso de animal promedio de

30 18 g y una razón de sangre con respecto a peso corporal típica para el ratón de 0,064.

La figura 10 representa la cinética de aclaramiento en sangre *in vivo*. La vida media de PAS(#1)200-IFNa2b es de aproximadamente 66 min., lo que concuerda con la vida media de 61 min. para PAS(#1)200-IFNa2b en el ejemplo 19, aunque se usó en este caso una dosis menor de 5 mg/kg p.c. en comparación con 7 mg/kg p.c. Por tanto, la variación de la línea de ratón y la dosis no tuvieron una influencia significativa en la farmacocinética. Las proteínas de fusión PAS(#1)400-IFNa2b y PAS(#1)600-IFNa2b tuvieron una vida media ampliada en más de 60 veces y 70 veces

35 de aproximadamente 316 min. y 406 min., respectivamente, en comparación con el IFNa2b recombinante no fusionado con una secuencia de polímero de aminoácidos. Las proteínas de fusión PAS(#5)192-IFNa2b y PAS(#5)384-IFNa2b tienen una vida media ampliada en más de 7 veces y 58 veces de aproximadamente 40 min. y 321 min., respectivamente. Estos datos muestran que la vida media plasmática *in vivo* de IFNa2b se prolonga significativamente debido a la fusión con los polímeros de Pro-Ala-Ser, mediante lo cual la vida media se vuelve más

40 larga con la longitud creciente del polímero de aminoácidos.

Ejemplo 21: Detección de la vida media plasmática prolongada para las proteínas de fusión recombinantes entre NGAL y el polímero PAS#1 codificado genéticamente *in vivo*.

Se inyectó por vía intravenosa a ratas Wistar hembra adultas según la siguiente tabla:

Grupo	A	B	C
Artículo de prueba	NGAL	NGAL-PAS(#1)100	NGAL-PAS(#1)200
Vía de administración	Intravenosa		
Dosis [mg/kg p.c.]	5,0	5,0	5,0
Concentración [mg/ml]	1,0	1,0	1,0
Volumen de aplicación [ml/kg p.c.]	5,0		
N.º de animales/grupo	6	6	6
N.º de puntos de tiempo de toma de muestras de sangre	8	8	8
N.º de animales/punto de tiempo de toma de muestras	3	3	3
N.º de tomas de muestras de sangre/animal	4	4	4

- 5 Se calculó el volumen total del artículo de prueba administrando por vía intravenosa según el peso corporal individual registrado en el día de la administración (por ejemplo, el animal n.º 104 con 210 g de peso corporal (p.c.) recibió 1050 µl de NGAL 1 mg/ml). Se realizó la toma de muestras de sangre 5 min., 10 min., 30 min., 60 min., 120 min., 240 min., 360 min. y 1440 min. tras la inyección según la siguiente tabla:

Grupo	Artículo de prueba	N.º de animal	Puntos de tiempo de toma de muestras de sangre (min. tras la administración)							
			5	10	30	60	120	240	360	1440
A	NGAL	104, 105	x		x		x		x	
		107, 108		x		x		x		x
B	NGAL-PAS(#1)100	110, 111	x		x		x		x	
		113, 114		x		x		x		x
C	NGAL-PAS(#1)200	116, 117	x		x		x		x	
		119, 120		x		x		x		

- 10 Para cada sustancia, se necesitaron dos animales de un grupo, proporcionando cada uno cuatro muestras en diferentes puntos de tiempo, mediante lo cual se realizaron los experimentos por duplicado. Se tomaron muestras de sangre (aproximadamente 0,5 ml cada una) con pipetas Pasteur del plexo retroorbital con ligera anestesia con éter y se transfirieron inmediatamente a viales de heparina de litio-Microvette®, se agitaron a mano, y se almacenaron en hielo triturado durante aproximadamente 20 min. Tras la centrifugación durante 10 min. a 10000 g y 4°C, se congeló inmediatamente el sobrenadante (plasma) y se almacenó a -80°C. Se sacrificaron los animales mediante inhalación de éter inmediatamente después de la última toma de muestras de sangre.

- 15 Para la detección cualitativa de la proteína de fusión en una inmunotransferencia de tipo Western, se diluyeron alícuotas de 100 µl de las muestras de plasma aclaradas con 400 µl de PBS. Se diluyeron 1,25 µl de las mismas (correspondientes a 0,25 µl de plasma) con 14,75 µl de PBS y se mezclaron con 4 µl de tampón de carga de SDS-PAGE (Tris/HCl 250 mM, pH 8,0, SDS al 7,5 % w/v, glicerol al 25 % v/v, azul de bromofenol 0,25 mg/ml) que contenía 2-mercaptoetanol al 12,5 % v/v. Tras calentamiento durante 5 min. a 95°C, se sometieron esas muestras a SDS-PAGE al 12 %. Tras la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) por medio de un aparato de inmunotransferencia semiseco, se colocó la membrana en una placa y se lavó 3 veces durante 20 min. con 10 ml de PBST (PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % v/v). Entonces, se incubó la membrana durante 10 min. en 20 ml de PBST que contenía avidina de clara de huevo 2 µg/ml para enmascarar los grupos de biotina unidos a proteínas endógenas y se añadieron directamente 20 µl de conjugado de fosfatasa alcalina-StrepTactin® (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) (a una dilución de 1:1000) y se continuó la incubación durante 60 min.

- 25 Tras lavar la membrana dos veces durante 5 min. con 20 ml de PBST y una vez durante 5 min. con 20 ml de tampón AP (Tris/HCl 100 mM, pH 8,8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), se realizó la reacción cromogénica (sin agitación) añadiendo 10 ml de tampón AP con 5 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT, Biomol, Hamburgo, Alemania; 75 mg/ml en DMF al 70 % w/v) y 30 µl de sal de p-toluidina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, Roth, Karlsruhe, Alemania); 50 mg/ml en DMF) hasta que aparecieron las bandas. Se detuvo la reacción mediante lavado con agua y secado al aire de la membrana.

- 35 La figura 11 muestra dos series de muestras mezcladas que contienen NGAL, NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 de puntos de tiempo equivalentes. Aunque NGAL ya no es detectable después de 10 min., NGAL-PAS(#1)100 y NGAL-PAS(#1)200 pueden detectarse durante periodos de hasta 120 min. Estos datos indican que la vida media plasmática de NGAL se prolonga significativamente cuando se fusiona con el polímero de Pro-Ala-Ser.

- Para la detección cuantitativa de la proteína de fusión en un ELISA, se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorb, NUNC, Dinamarca) durante la noche a 4°C con 50 µl de una disolución 5 µg/ml de un anticuerpo anti-lipocalina-2/NGAL humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) en PBS. Tras lavar tres veces con PBST, se bloquearon los pocillos con 200 µl de BSA al 3 % (p/v) en PBST durante 2 h y se lavaron de nuevo tres veces con PBST. Se aplicaron las muestras de plasma de los animales 104/105 (NGAL) y 116/117 (NGAL-PAS(#1)200) en series de dilución con PBST que contenía plasma de rata al 2,5 % (v/v) de animales no tratados (Elevage Janvier, Le Genest ST. Isle, Francia; Aurigon Life Science, Tutzing, Alemania) y se incubaron durante 1,5 h. Entonces se lavaron los pocillos tres veces con PBST y se incubaron durante 1 h con 50 µl de una dilución 1:1000 de conjugado de fosfatasa alcalina-StrepTactin®. Tras lavar dos veces con PBST y dos veces con PBS, se inició la reacción cromogénica añadiendo 50 µl de fosfato de p-nitrofenilo 0,5 µg/ml en tampón AP como sustrato y tras 20 min. a 25°C, se midió la absorbancia a 405 nm. Se cuantificaron las concentraciones de NGAL y NGAL-PAS(#1)200 en las muestras de plasma mediante comparación con curvas patrón que se determinaron para las series de dilución para las proteínas purificadas correspondientes a concentraciones definidas en PBST que contenía plasma de rata al 2,5 % (v/v) de animales no tratados.
- Para estimar la vida media plasmática de NGAL y NGAL-PAS(#1)200, se representaron gráficamente los valores de concentración,  $c(t)$ , determinados a partir de las mediciones de ELISA frente al tiempo tras la inyección intravenosa,  $t$ , y se ajustaron de forma numérica usando el software KaleidaGraph. Se supuso una disminución monoexponencial según la ecuación

$$c(t) = c_0 e^{-\ln 2 \frac{t}{\tau_{1/2}}}$$

- mediante lo cual  $\tau_{1/2}$  es el parámetro de vida media plasmática, y  $c_0$  es la concentración sanguínea total en el punto de tiempo cero, que debe tener un valor de aproximadamente 80 µg/ml con la suposición de un peso de animal promedio de 210 g y una razón de sangre con respecto a peso corporal típica para la rata de 0,064.

- La figura 12 representa la cinética de aclaramiento en sangre *in vivo*. Aunque NGAL recombinante muestra un aclaramiento rápido de la sangre con una vida media de sólo aproximadamente 3 min., la proteína de fusión NGAL-PAS(#1)200 tiene una vida media ampliada en diez veces de aproximadamente 31 min. Estos datos concuerdan con el análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostrado anteriormente y demuestran que la vida media plasmática *in vivo* de NGAL se prolonga significativamente debido a la fusión con el polímero de Pro-Ala-Ser.

Ejemplo 22: Comparación de la actividad de IntronA disponible comercialmente y PAS(#1)200-IFNa2b recombinante mediante el ensayo de liberación de IP-10 con PBMC humanas.

- Se estimularon  $2 \times 10^5$  PBMC humanas en un volumen total de 100 µl durante 24 h a 37°C con una serie de dilución de IntronA (Schering Corporación, Kenilworth, NJ), PAS(#1)200-IFNa2b y un fragmento Fab recombinante no relacionado como control negativo. La concentración inicial para las tres proteínas de prueba fue de  $10^6$  U/ml con respecto a la actividad específica de  $2,6 \times 10^8$  U/mg para IntronA tal como se especifica en la ficha técnica. Se usó esta concentración unitaria específica para calcular concentraciones unitarias iguales para la cantidad de PAS(#1)200-IFNa2b y una cantidad equivalente del fragmento Fab recombinante. Se determinó la concentración del IP-10 liberado (CXCL10; proteína de 10 kDa inducible por interferón gamma) en el sobrenadante tras la inducción por interferón alfa usando el conjunto de ELISA para IP-10 humana (BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen, EE.UU.).

- La figura 13 representa la actividad de las tres proteínas de prueba. Aunque PAS(#1)200-IFNa2b recombinante muestra a concentraciones superiores actividades comparables a IntronA, este último es más activo a concentraciones inferiores, dando un promedio de perfil de actividad similar. Las PBMC no estimuladas así como las PBMC estimuladas con el fragmento Fab no liberaron cantidades significativas de IP-10. Como se eliminaron las endotoxinas, que también podrían inducir la liberación de IP-10, en las preparaciones tanto de PAS(#1)200-IFNa2b como del fragmento Fab tal como se describió en el ejemplo 5, la actividad de PAS(#1)200-IFNa2b puede atribuirse claramente al resto de IFNa2b de la proteína de fusión. Por tanto, el polímero de Pro-Ala-Ser no interfiere con la actividad biológica de IFNa2b.

La presente invención también se refiere a los siguientes puntos:

#### Puntos

- Una proteína biológicamente activa que comprende al menos dos dominios, en la que
  - un primer dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica; y
  - un segundo dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que consiste preferiblemente en al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido que forma una

conformación de espiral al azar

por la que dicha conformación de espiral al azar media una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa.

- 5 2. La proteína biológicamente activa según el punto 1, en la que dicho segundo dominio que forma una conformación de espiral al azar consiste en residuos de alanina, serina y prolina.
3. La proteína biológicamente activa según el punto 1 ó 2, en la que dicho segundo dominio que forma una conformación de espiral al azar comprende una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en la que dicha repetición consiste en residuos de Ala, Ser y Pro y en la que no más de 6 residuos de aminoácido consecutivos son idénticos.
- 10 4. La proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que dichos residuos de prolina constituyen más del 4 % y menos del 40 % de los aminoácidos de dicho segundo dominio que forma una conformación de espiral al azar.
5. La proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en la que dicho segundo dominio comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en
  - 15 ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 18);
  - AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 20);
  - APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 22),
  - SAPSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 63),
  - SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO: 24),
  - 20 AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 26) y
  - ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 28)
 o versiones permutadas circulares o (un) multímero(s) de estas secuencias en su totalidad o partes de estas secuencias.
- 25 6. La proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que dicho segundo dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en aproximadamente de 100 a 3000 residuos de aminoácido que forman una conformación de espiral al azar.
7. La proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en la que dicho polipéptido con actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en moléculas de unión, fragmentos de anticuerpo, citocinas, factores de crecimiento, hormonas o enzimas.
- 30 8. La proteína biológicamente activa según el punto 7, en la que dicha molécula de unión se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, peptidomiméticos derivados de CDR, fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), lectinas y lipocalinas.
9. La proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en la que dicho polipéptido con actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, hormona de crecimiento humana, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factor de necrosis tumoral, eritropoyetina, factor de coagulación VIII, gp120/gp160, receptores solubles I y II del factor de necrosis tumoral, reteplasa, exendina-4, anakinra, interleucina-2 y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos.
- 35 10. La proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en la que dicha estabilidad aumentada *in vivo* de dicha proteína biológicamente activa es una vida media plasmática prolongada de dicha proteína biológicamente activa que comprende dicho segundo dominio que forma una espiral al azar en comparación con dicha proteína biológicamente activa que carece de dicho segundo dominio que forma una espiral al azar.
- 40 11. Una composición que comprende la proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 10.
- 45 12. La composición según el punto 11, que es una composición farmacéutica, que comprende además opcionalmente un portador farmacéutico aceptable.
13. Una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína biológicamente activa según uno cualquiera

de los puntos 1 a 10.

14. Un vector que comprende el ácido nucleico del punto 13.
15. Una célula que comprende el ácido nucleico según el punto 13 o el vector según el punto 14.
- 5 16. Un método para la preparación de la proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, que comprende cultivar la célula según el punto 15 y aislar dicha proteína biológicamente activa del cultivo.
- 10 17. Uso de la proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, el ácido nucleico según el punto 13, el vector según el punto 14 o la célula según el punto 15 para la preparación de un medicamento que tiene una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa para el tratamiento de trastornos relacionados con una deficiencia hormonal, enfermedad autoinmune, cáncer, anemia, enfermedades neovasculares, enfermedades infecciosas/inflamatorias, trombosis, infarto de miocardio, diabetes y lesión por reperfusión u otras enfermedades renales.
- 15 18. La proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, el ácido nucleico según el punto 13, el vector según el punto 14 o la célula según el punto 15 para el uso como medicamento que tiene una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa.
19. Kit que comprende la proteína biológicamente activa según uno cualquiera de los puntos 1 a 10, el ácido nucleico según el punto 13, el vector según el punto 14 o la célula según el punto 15.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Technische Universität München
- <120> Proteínas activas biológicas que tienen estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro*
- <130> N1303 EP/1 S3
- 5 <140> EP 08 77 3567.6
- <141> 20-06-2008
- <150> EP 07 01 2219.7
- <151> 21-06-2007
- <150> US 61/071.705
- 10 <151> 14-05-2008
- <160> 63
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 60
- 15 <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos piSA"
- 20 <400> 1
- gccgctgctg caccctctgc aagctccgct tcttcctcta gctccgcagc tgcactgct 60
- <210> 2
- <211> 20
- 25 <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos piSA"
- 30 <400> 2
- Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
1 5 10 15
- Ala Ala Ser Ala  
20
- <210> 3
- <211> 60
- <212> ADN

<213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos"  
 5 <400> 3  
 gctgcttccg ctgctgcttc ctccgctgct gcttccgctg ctgctgcttc cgcttctctcc 60  
 <210> 4  
 <211> 20  
 10 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos"  
 15 <400> 4  
 Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ser Ser  
 20  
 <210> 5  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 20 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos"  
 25 <400> 5  
 gcttccgctt ccgcttccgc ttccgcttcc gcttctctccg ctgcttccgc tgettccgct 60  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 30 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos"  
 <400> 6

ES 2 422 007 T3

Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ala Ser  
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala  
20

<210> 7

<211> 60

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos"

10 <400> 7

tccgctgctt cctcctccgc ttctctctcc tccgctgctt cctccgcttc cgctgctgct 60

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos"

<400> 8

Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala  
20

20

<210> 9

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos"

<400> 9

tctctctcct ccgctgcttc cgctgcttcc gctgctgctg ctgcttcctc ctccgcttcc 60

30

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos"

<400> 10

Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ser  
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser  
20

10 <210> 11

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos"

<400> 11

tctctcgcgtt cctcctccgc tgcttctctc tccgcttctt cctcctccgc ttccgctgct 60

20 <210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos"

<400> 12

Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala  
20

<210> 13

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos"

<400> 13

tccgcttccg cttccgcttc cgcttccgct tccgctgctt cctccgcttc ctccgcttcc 60

10 <210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos"

<400> 14

Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser  
20

<210> 15

20 <211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos"

<400> 15

gcttcctccg ctgctgcttc cgctgctgct gcttcctccg ctgcttccgc ttctctctcc 60

<210> 16

30 <211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos"

<400> 16

Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser  
 20

5

<210> 17

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos PAS#1"

<400> 17

gcctctccag ctgcacctgc tccagcaagc cctgctgcac cagctccgtc tgctcctgct 60

15

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos PAS#1"

<400> 18

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
 1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala  
 20

25

<210> 19

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

30

<221> fuente

ES 2 422 007 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos PAS#2"

<400> 19

gctgctccgg cttccccggc tccggctgct ccgctccgctc cggctccggc tgctccgctc 60

5 <210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos PAS#2"

<400> 20

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser  
20

<210> 21

15 <211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos PAS#3"

<400> 21

gctccgtcct ccccgctccc gtcgctccg tctctcccgt ccccgcttc cccgctctcc 60

<210> 22

25 <211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos PAS#3"

<400> 22

ES 2 422 007 T3

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser  
20

<210> 23

<211> 60

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos PAS#4"

10 <400> 23

tcctcccgt cgcctcgc cccgtctcc cgggttccc cgtcccgc ctcccggct 60

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos PAS#4"

<400> 24

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro  
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala  
20

20

<210> 25

<211> 72

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos PAS#5"

<400> 25

ES 2 422 007 T3

gccgcttctc cagcagctcc ttctgctcca ccagcagctg caagccctgc tgcaccaagc 60  
gcacctctg ct 72

<210> 26

<211> 24

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos PAS#5"

<400> 26

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala  
20

10

<210> 27

<211> 60

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para el polímero de aminoácidos PAS#1P2"

<400> 27

gcctctgctg cagcacctgc agcagcaagc gcagctgcat ctgctccatc tgcagctgct 60

20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos PAS#1P2"

<400> 28

ES 2 422 007 T3

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro  
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala  
20

<210> 29

<211> 63

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#1"

10 <400> 29

gcctctccag ctgcacctgc tccagcaagc cctgctgcac cagctccgtc tgctcctgct 60  
gcc 63

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#1"

20 <400> 30

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Ala  
20

<210> 31

<211> 63

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#2"

ES 2 422 007 T3

<400> 31

gccgcacctg cttctccggc tccagcagct cctagcgcac cagctcctgc tgctccatct 60

gcc 63

<210> 32

<211> 21

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#2"

<400> 32

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala  
20

<210> 33

<211> 63

15 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#3"

<400> 33

gccccttctt ctccaagccc ttctgctcca tctagcccat ctctgcac tctagctct 60

gcc 63

<210> 34

<211> 21

25 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#3"

<400> 34

ES 2 422 007 T3

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala  
 1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser Ala  
 20

<210> 35

<211> 75

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#5"

10 <400> 35

gccgcttctc cagcagctcc ttctgctcca ccagcagctg caagccctgc tgcaccaagc 60

gcacctcctg ctgcc 75

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#5"

20 <400> 36

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro  
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala  
 20 25

<210> 37

<211> 63

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para piSA"

ES 2 422 007 T3

<400> 37

gccgctgctg catcctctgc aagctccgct tcttcctcta gctccgcagc tgcactgct 60

gcc 63

<210> 38

<211> 21

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para piSA"

10 <400> 38

Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Ala  
20

<210> 39

<211> 63

<212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#1P2"

20 <400> 39

gcctctgctg cagcacctgc agcagcaagc gcagctgcat ctgctccatc tgcagctgct 60

gcc 63

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

25 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos para un elemento estructural para PAS#1P2"

30 <400> 40

ES 2 422 007 T3

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro  
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Ala  
 20

<210> 41

<211> 622

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del polímero PAS#1 con 200 residuos"

10 <400> 41

tgctcttctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	60
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	120
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	180
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	240
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	300
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	360
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	420
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	480
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	540
gctcctgctg cctctccagc tgcacctgct ccagcaagcc ctgctgcacc agctccgtct	600
gctcctgctg cctgaagagc tt	622

<210> 42

<211> 201

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos del polímero PAS#1 con 200 residuos"

<400> 42

ES 2 422 007 T3

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala  
20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
35 40 45

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala  
50 55 60

Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala  
65 70 75 80

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
85 90 95

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala  
100 105 110

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
115 120 125

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala  
130 135 140

Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala  
145 150 155 160

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
165 170 175

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala  
180 185 190

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala  
195 200

<210> 43

<211> 526

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de IFN a2b y Strep-tag II"

ES 2 422 007 T3

<400> 43

```
gaaaaaggcg ccagctcttc tgcctgtgat ctgcctcaaa cccacagcct gggtagcagg      60
aggaccttga tgctcctggc acagatgagg agaatctctc ttttctcctg cttgaaggac      120
agacatgact ttggatttcc ccaggaggag tttggcaacc agttccaaaa ggctgaaacc      180
atccctgtcc tccatgagat gatccagcag atcttcaatc tcttcagcac aaaggactca      240
tctgctgctt gggatgagac cctcctagac aaattctaca ctgaactcta ccagcagctg      300
aatgacctgg aagcctgtgt gatacagggg gtgggggtga cagagactcc cctgatgaag      360
gaggactcca ttctggctgt gaggaaatac ttccaaagaa tcaactctcta tctgaaagag      420
aagaaataca gcccttgtgc ctgggagggt gtcagagcag aaatcatgag atctttttct      480

ttgtcaacaa acttgcaaga aagtttaaga agtaaggaat aagctt                          526
```

<210> 44

5 <211> 173

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de IFN a2b y Strep-tag II"

<400> 44

ES 2 422 007 T3

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile  
 20 25 30  
 Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln  
 35 40 45  
 Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu  
 50 55 60  
 His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu  
 85 90 95  
 Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly  
 100 105 110  
 Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg  
 115 120 125  
 Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser  
 130 135 140  
 Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu  
 165 170

<210> 45

<211> 1126

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de IFN a2b tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1"

10 <400> 45

ES 2 422 007 T3

gaaaaaggcg ccagctcttc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 60  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 120  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 180  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 240  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 300  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 360  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 420  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 480  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 540  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccttgctgca 600  
 ccagctccgt ctgctcctgc tgcctgtgat ctgcctcaaa cccacagcct gggtagcagg 660  
 aggaccttga tgctcctggc acagatgagg agaattcttc ttttctcctg cttgaaggac 720  
 agacatgact ttggatttcc ccaggaggag tttggcaacc agttccaaaa ggctgaaacc 780  
 atccctgtcc tccatgagat gatccagcag atcttcaatc tcttcagcac aaaggactca 840  
 tctgctgctt gggatgagac cctcctagac aaattctaca ctgaactcta ccagcagctg 900  
 aatgacctgg aagcctgtgt gatacagggg gtgggggtga cagagactcc cctgatgaag 960  
 gaggactcca ttctggctgt gaggaatac ttcaaagaa tcaacttcta tctgaaagag 1020  
 aagaaataca gcccttgtgc ctgggaggtt gtcagagcag aaatcatgag atctttttct 1080  
 ttgtcaacaa acttgcaaga aagtttaaga agtaaggaat aagctt 1126

<210> 46

<211> 373

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de IFN a2b tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1"

10 <400> 46

ES 2 422 007 T3

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala  
 20 25 30  
 Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala  
 35 40 45  
 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser  
 50 55 60  
 Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala  
 85 90 95  
 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala  
 115 120 125  
 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser  
 130 135 140  
 Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala  
 165 170 175  
 Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala  
 180 185 190  
 Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala  
 195 200 205  
 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met  
 210 215 220

ES 2 422 007 T3

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp  
 225 230 235 240

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln  
 245 250 255

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe  
 260 265 270

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu  
 275 280 285

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu  
 290 295 300

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys  
 305 310 315 320

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu  
 325 330 335

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg  
 340 345 350

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser  
 355 360 365

Leu Arg Ser Lys Glu  
 370

<210> 47

<211> 487

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de IL-1ra y Strep-tag II"

10 <400> 47

gaaaaaggcg ccagctcttc tgcccgaccc tctgggagaa aatccagcaa gatgcaagcc 60

ttcagaatct gggatgtaa ccagaagacc ttctatctga ggaacaacca actagttgct 120

ggatacttgc aaggaccaaa tgtcaattta gaagaaaaga tagatgtggt acccattgag 180

ES 2 422 007 T3

cctcatgctc tgttcttggg aatccatgga ggaagatgt gcctgtcctg tgtcaagtct 240  
 ggtgatgaga ccagactcca gctggaggca gttaacatca ctgacctgag cgagaacaga 300  
 aagcaggaca agcgcttcgc cttcatccgc tcagacagcg gccccaccac cagttttgag 360  
 tctgccgcct gccccggttg gttcctctgc acagcgatgg aagctgacca gcccgtcagc 420  
 ctcaccaata tgcctgacga aggcgtcatg gtcaccaaatt tctacttcca ggaggacgag 480  
 taagctt 487

<210> 48

<211> 160

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de IL-1ra y Strep-tag II"

<400> 48

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser  
 1 5 10 15

Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr  
 20 25 30

Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val  
 35 40 45

Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu  
 50 55 60

Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser  
 65 70 75 80

Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu  
 85 90 95

Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp  
 100 105 110

Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe  
 115 120 125

Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met  
 130 135 140

ES 2 422 007 T3

Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu  
 145 150 155 160

<210> 49

<211> 1087

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de IL-1ra tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1"

10 <400> 49

```

gaaaaaggcg ccagctcttc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      60
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      120
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      180
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      240
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      300
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      360
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      420
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      480
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      540
ccagctccgt ctgctcctgc tgcctctcca gctgcacctg ctccagcaag ccctgctgca      600
ccagctccgt ctgctcctgc tgccccaccc tctgggagaa aatccagcaa gatgcaagcc      660
ttcagaatct gggatgtaa ccagaagacc ttctatctga ggaacaacca actagttgct      720
ggatacttgc aaggacaaa tgtcaattta gaagaaaaga tagatgtggt acccattgag      780
cctcatgctc tgttcttggg aatccatgga ggggaagatgt gcctgtcctg tgtcaagtct      840
ggtgatgaga ccagactcca gctggaggca gttaacatca ctgacctgag cgagaacaga      900
aagcaggaca agcgcttcgc cttcatccgc tcagacagcg gccccaccac cagttttgag      960
tctgccgctt gccccggttg gttcctctgc acagcgatgg aagctgacca gcccgtcagc     1020
ctcaccaata tgcctgacga aggcgtcatg gtcaccaaat tctacttcca ggaggacgag     1080
taagctt                                           1087
    
```

<210> 50

<211> 360

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

ES 2 422 007 T3

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de IL-1ra tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1

5 <400> 50

Glu Lys Gly Ala Ser Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala  
20 25 30

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala  
35 40 45

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser  
50 55 60

Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala  
65 70 75 80

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala  
85 90 95

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala  
100 105 110

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala  
115 120 125

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser  
130 135 140

Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala  
145 150 155 160

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala  
165 170 175

Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala  
180 185 190

ES 2 422 007 T3

Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala  
 195 200 205

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp  
 210 215 220

Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala  
 225 230 235 240

Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val  
 245 250 255

Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys  
 260 265 270

Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu  
 275 280 285

Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys  
 290 295 300

Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu  
 305 310 315 320

Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp  
 325 330 335

Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr  
 340 345 350

Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu  
 355 360

<210> 51

<211> 55

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de una variante de NGAL que porta la Strep-tag II"

10 <400> 51

cagtgtatcg aggccccagc ttggtccac ccgcagttcg aaaaataata agctt

55

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

ES 2 422 007 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de una variante de NGAL que porta la Strep-tag II"

<400> 52

Gln Cys Ile Glu Ala Pro Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 1 5 10 15

<210> 53

<211> 655

10 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de NGAL tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1 seguido por Strep-tag II"

<400> 53

```

cagtgtatcg aggcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      60
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      120
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      180
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      240
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      300
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      360
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      420
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      480
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      540
tctgctcctg ctgcctctcc agctgcacct gctccagcaa gccctgctgc accagctccg      600
tctgctcctg ctgccccagc ttgggtccac ccgcagttcg aaaaataata agctt          655
  
```

<210> 54

20 <211> 215

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

ES 2 422 007 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de NGAL tras la inserción de la secuencia del polímero PAS#1 seguido por Strep-tag II"

<400> 54

Gln Cys Ile Glu Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala  
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
 20 25 30

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala  
 35 40 45

Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala  
 50 55 60

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
 65 70 75 80

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala  
 85 90 95

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
 100 105 110

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala  
 115 120 125

Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala  
 130 135 140

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
 145 150 155 160

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala  
 165 170 175

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
 180 185 190

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Pro Ala Trp  
 195 200 205

Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 210 215

5 <210> 55

<211> 41

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: tramo de la secuencia de nucleótidos de pASK-2x SapI"

5 <400> 55

accgcggaga gtgctcttct gcctgaagag ctttaagcttt g 41

<210> 56

<211> 60

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: tres copias repetidas del polímero de aminoácidos piSA"

<400> 56

Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser  
20 25 30

Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ser  
35 40 45

Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ala  
50 55 60

15

<210> 57

<211> 60

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: tres copias repetidas del polímero de aminoácidos PAS#1"

<400> 57

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

ES 2 422 007 T3

Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala  
20 25 30

Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
35 40 45

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala  
50 55 60

<210> 58

<211> 72

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: tres copias repetidas del polímero de aminoácidos PAS#5"

<400> 58

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser  
20 25 30

Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala  
35 40 45

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro  
50 55 60

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala  
65 70

10

<210> 59

<211> 45

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador"

<400> 59

tctgtgggcg ccagctcttc tgcctgtgat ctgcctcaaa cccac

45

20 <210> 60

<211> 30  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 5 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador"  
 <400> 60  
**gaaccaaagc ttattcctta cttcttaaac** 30  
  
 <210> 61  
 10 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador"  
 <400> 61  
**acgatgggcg ccagctcttc tgcccgacct tctgggagaa aatcc** 45  
  
 <210> 62  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador"  
 25 <400> 62  
**ctgggcaagc ttactcgtcc tcctggaagt ag** 32  
  
 <210> 63  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 30 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polímero de aminoácidos PAS#3 modificado"  
 <400> 63

ES 2 422 007 T3

Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Ser Pro Ser  
20

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína biológicamente activa que comprende al menos dos dominios, en la que
  - (a) un primer dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que tiene y/o que media dicha actividad biológica; y
  - 5 (b) un segundo dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos 350 residuos de aminoácido que forma una conformación de espiral al azar tal como se determina mediante medición de espectroscopía de dicroísmo circular
 

por la que dicha conformación de espiral al azar media una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa.
- 10 2. Proteína biológicamente activa según la reivindicación 1, en la que dicho segundo dominio que forma una conformación de espiral al azar consiste en residuos de alanina, serina y prolina.
3. Proteína biológicamente activa según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho segundo dominio que forma una conformación de espiral al azar comprende una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en la que dicha repetición consiste en residuos de Ala, Ser y Pro y en la que no más de 6 residuos de aminoácido
 

15 consecutivos son idénticos.
4. Proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichos residuos de prolina constituyen más del 4 % y menos del 40 % de los aminoácidos de dicho segundo dominio que forma una conformación de espiral al azar.
- 20 5. Proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho segundo dominio comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en
 

ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 18);

AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 20);

APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 22),

SAPSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 63),

25 SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO: 24),

AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 26) y

ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 28)

o versiones permutadas circulares o (un) múltiplo(s) de estas secuencias en su totalidad o partes de estas secuencias.
- 30 6. Proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho segundo dominio de dichos al menos dos dominios comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en de 400 a 3000 residuos de aminoácido que forman una conformación de espiral al azar.
7. Proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho polipéptido con actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en moléculas de unión, fragmentos
 

35 de anticuerpo, citocinas, factores de crecimiento, hormonas o enzimas.
8. Proteína biológicamente activa según la reivindicación 7, en la que dicha molécula de unión se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, peptidomiméticos derivados de CDR, fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), lectinas y lipocalinas.
9. Proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho polipéptido con actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, hormona de crecimiento humana, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, factor de necrosis tumoral, eritropoyetina, factor de coagulación VIII, gp120/gp160, receptores solubles I y II del factor de necrosis tumoral, reteplasa, exendina-4, anakinra, interleucina-2 y lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos.
- 40 10. Proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha estabilidad aumentada *in vivo* de dicha proteína biológicamente activa es una vida media plasmática prolongada de dicha proteína biológicamente activa que comprende dicho segundo dominio que forma una espiral al azar en comparación con dicha proteína biológicamente activa que carece de dicho segundo

dominio que forma una espiral al azar.

11. Composición que comprende la proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 5 12. Composición según la reivindicación 11, que es una composición farmacéutica, que comprende además opcionalmente un portador farmacéutico aceptable.
13. Molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
14. Vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Célula que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 13 o el vector según la reivindicación 14.
- 10 16. Método para la preparación de la proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar la célula según la reivindicación 15 y aislar dicha proteína biológicamente activa del cultivo.
- 15 17. Uso de la proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el ácido nucleico según la reivindicación 13, el vector según la reivindicación 14 o la célula según la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento que tiene una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa para el tratamiento de trastornos relacionados con una deficiencia hormonal, enfermedad autoinmune, cáncer, anemia, enfermedades neovasculares, enfermedades infecciosas/inflamatorias, trombosis, infarto de miocardio, diabetes y lesión por reperfusión u otras enfermedades renales.
- 20 18. Proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, ácido nucleico según la reivindicación 13, vector según la reivindicación 14 o célula según la reivindicación 15 para el uso como medicamento que tiene una estabilidad aumentada *in vivo* y/o *in vitro* de dicha proteína biológicamente activa.
- 25 19. Kit que comprende la proteína biológicamente activa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el ácido nucleico según la reivindicación 13, el vector según la reivindicación 14 o la célula según la reivindicación 15.

Figura 1

**A**

```

gccTCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCAAGCCCTGCTGCACCAGCTCCGTCTGCTCCTGCT
|||||
AGAGGTCGACGTGGACGAGGTCGTTCTGGGACGACGTGGTCGAGGCAGACGAGGACGAcgg
AlaSerProAlaAlaProAlaProAlaSerProAlaAlaProAlaProSerAlaProAlaAla
    
```

**B**

```

gccGCACCTGCTTCTCCGGCTCCAGCAGCTCCTAGCGCACCAGCTCCTGCTGCTCCATCT
|||||
CGTGGACGAAGAGGCCGAGGTCGTCGAGGATCGCGTGGTCGAGGACGACGAGGTAGAcgg
AlaAlaProAlaSerProAlaProAlaAlaProSerAlaProAlaProAlaAlaProSerAla
    
```

**C**

```

gccCCTTCTTCTCCAAGCCCTTCTGCTCCATCTAGCCCATCTCCTGCATCTCCTAGCTCT
|||||
GGAAGAAGAGGTTCTGGGAAGACGAGGTAGATCGGGTAGAGGACGTAGAGGATCGAGAcgg
AlaProSerSerProSerProSerAlaProSerSerProSerProAlaSerProSerSerAla
    
```

**D**

```

gccGCTTCTCCAGCAGCTCCTTCTGCTCCACCAGCAGCTGCAAGCCCTGCTGCACCAAGCGCACCTCCTGCT
|||||
CGAAGAGGTTCGTCGAGGAAGACGAGGTGGTCGTCGACGTTCTGGGACGACGTGGTTCGCGTGGAGGACGAcgg
AlaAlaSerProAlaAlaProSerAlaProProAlaAlaAlaSerProAlaAlaProSerAlaProProAlaAla
    
```

**E**

```

gccTCTGCTGCAGCACCTGCAGCAGCAAGCGCAGCTGCATCTGCTCCATCTGCAGCTGCT
|||||
AGACGACGTCGTGGACGTCGTCGTTCTGCGTCGACGTAGACGAGGTAGACGTCGACGAcgg
AlaSerAlaAlaAlaProAlaAlaAlaSerAlaAlaAlaSerAlaProSerAlaAlaAlaAla
    
```

**F**

```

gccGCTGCTGCATCCTCTGCAAGCTCCGCTTCTTCTCTAGCTCCGACGCTGCATCTGCT
|||||
CGACGACGTAGGAGACGTTTCGAGGCCAAGAAGGAGATCGAGGCGTCGACGTAGACGAcgg
AlaAlaAlaAlaSerSerAlaSerSerAlaSerSerSerSerSerAlaAlaAlaSerAlaAla
    
```

Figura 2

**A**

```

                SapI SapI
                |  |
ACCGCGGAGAGTGCTCTTCTGCCTGAAGAGCTTAAGCTTTG
1610 +-----+-----+-----+-----+-----+ 1650
TGGCGCCTCTCCGAGAAGACGGACTTCTCGAATTCGAAAC
    
```

**B**

```

                SapI                               SapI
                |                                 |
TGCTCTTCTGCCTCTCCAGCTGCACCT...CCGTCTGCTCCTGCTGCCTGAAGAGCTT
1621 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2242
ACGAGAAGACGGAGAGGTCGACGTGGA...GGCAGACGAGGACGACGGACTTCTCGAA
                AlaSerProAlaAlaPro...ProSerAlaProAlaAla
    
```

**C**

```

                KasI           SapI
                |             |
GAAAAAGGCGCCAGCTCTTCTGCCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGC...
226 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 282
CTTTTCCGCGGTCGAGAAGACGGACTAGACGGAGTTGGGTGTGGACCCATCG...
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaCysAspLeuProGlnThrHisSerLeuGlySer...
                +1

                                                HindIII
                                                |
...ATGAGATCTTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTAAGAAGTAAGGAATAAGCTT
691 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 751
...TACTCTAGAAAAAGAAACAGTTGTTTGAACGTTCTTTCAAATTCTTCATTCCTTATTCGAA
MetArgSerPheSerLeuSerThrAsnLeuGlnGluSerLeuArgSerLysGluEnd
    
```

D

```

          KasI          SapI
          |             |
GAAAAAGGCGCCAGCTCTTCTGCCTCTCCAGCTGCACCT...CCGTCTGCTCCTGCTGCC
226 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 849
CTTTTTCCGCGGTCGAGAAGACGGAGAGGTTCGACGTGGA...GGCAGACGAGGACGACGG
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaSerProAlaAlaPro...ProSerAlaProAlaAla

                                     HindIII
                                     |
TGTGATCTGCCTCAAACCCAC...TTGCAAGAAAGTTAAGAAGTAAGGAATAAGCTT
850 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1351
ACACTAGACGGAGTTTGGGTG...AACGTTCTTTCAAATCTTCATTCTTATTCGAA
CysAspLeuProGlnThrHis...LeuGlnGluSerLeuArgSerLysGluEnd
(1)

```

E

```

          KasI          SapI
          |             |
GAAAAAGGCGCCAGCTCTTCTGCCCGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAA...
226 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 282
CTTTTTCCGCGGTCGAGAAGACGGGCTGGGAGACCCTCTTTTAGGTCGTTCTACGTT...
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaArgProSerGlyArgLysSerSerLysMetGln...
                                     +1

                                     HindIII
                                     |
...AATATGCCTGACGAAGGCGTCATGGTCACCAAATCTACTTCCAGGAGGACGAGTAAGCTT
652 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 712
...TTATACGGACTGCTTCCGCAGTACCAGTGGTTAAGATGAAGGTCCTCCTGCTCATTCGAA
...AsnMetProAspGluGlyValMetValThrLysPheTyrPheGlnGluAspGluEnd

```

F

```

          KasI          SapI
          |             |
GAAAAAGGCGCCAGCTCTTCTGCCTCTCCAGCTGCACCT...CCGTCTGCTCCTGCTGCC
226 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 849
CTTTTTCCGCGGTCGAGAAGACGGAGAGGTTCGACGTGGA...GGCAGACGAGGACGACGG
GluLysGlyAlaSerSerSerAlaSerProAlaAlaPro...ProSerAlaProAlaAla

                                     HindIII
                                     |
CGACCCTCTGGGAGAAA...ACCAAATCTACTTCCAGGAGGACGAGTAAGCTT
850 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1312
GCTGGGAGACCCTCTTTT...TGGTTAAGATGAAGGTCCTCCTGCTCATTCGAA
ArgProSerGlyArgLys...ThrLysPheTyrPheGlnGluAspGluEnd
(1)

```

**G**

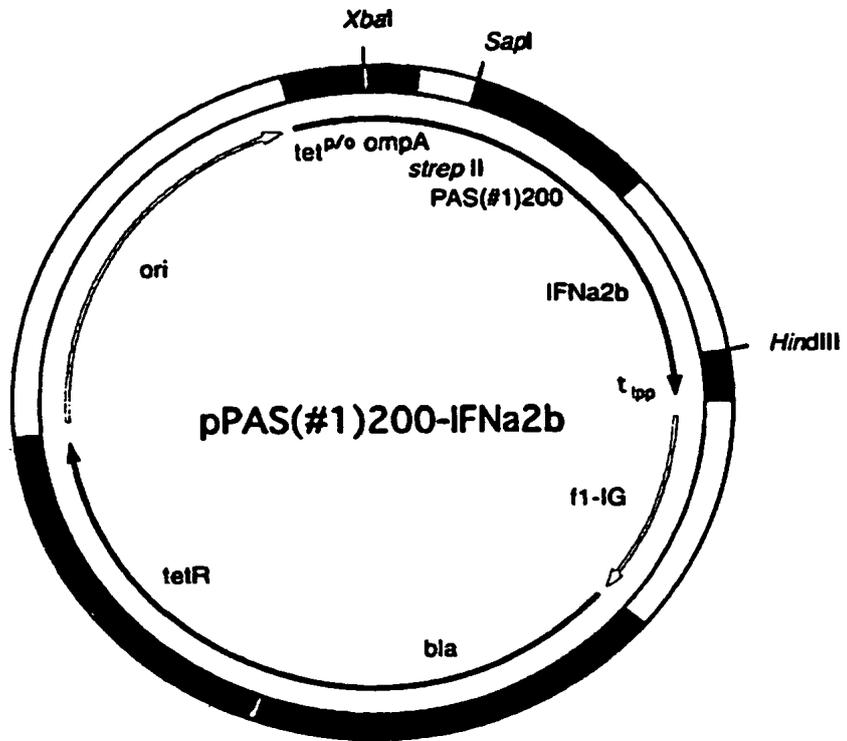


Figura 3

**A**

*Eco*O109I

|

```

604  CAGTGTATCGAGGCCCCAGCTTGGTCCCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAAGCTT 658
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCACATAGCTCCGGGGTTCGAACCAGGGTGGGCGTCAAGCTTTTATTATTTCGAA
GlnCysIleGluAlaProAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEnd
    
```

**B**

```

604  CAGTGTATCGAGGCCCTCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCAAGC... 645
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCACATAGCTCCGGAGAGGTTCGACGTGGACGAGGTTCGTTTCG...
GlnCysIleGluAlaSerProAlaAlaProAlaProAlaSer...
    
```

```

...TCTGCTCCTGCTGCCCCAGCTTGGTCCCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAAGCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1204 ..AGACGAGGACGACGGGGTTCGAACCAGGGTGGGCGTCAAGCTTTTATTATTTCGAA 1258
...SerAlaProAlaAlaProAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEnd
    
```

**C**

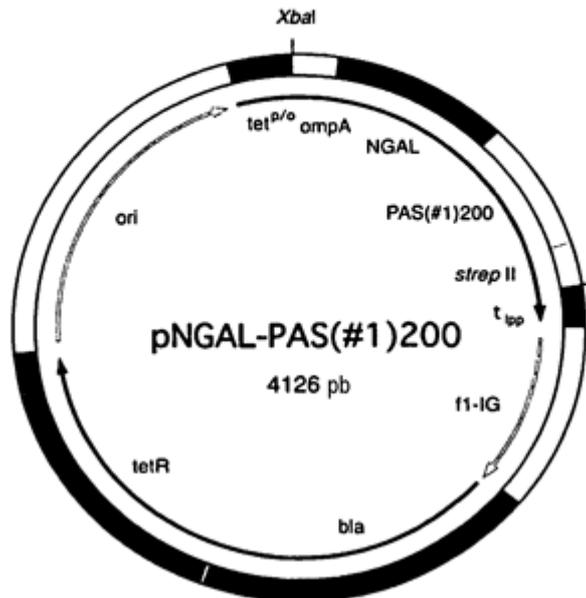
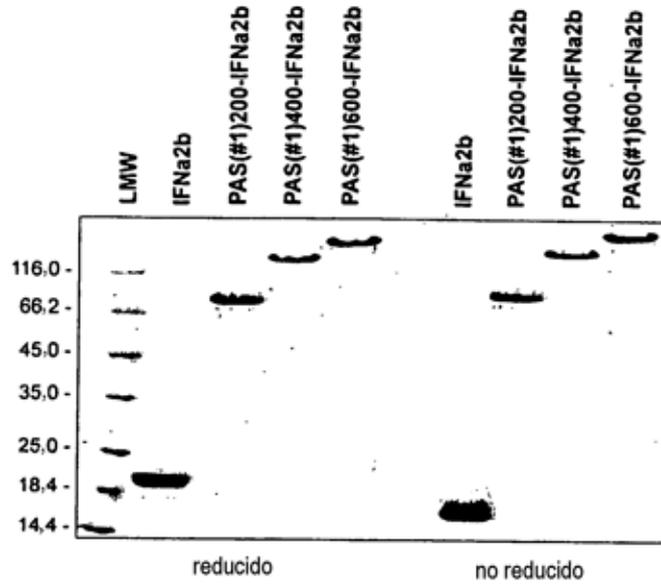
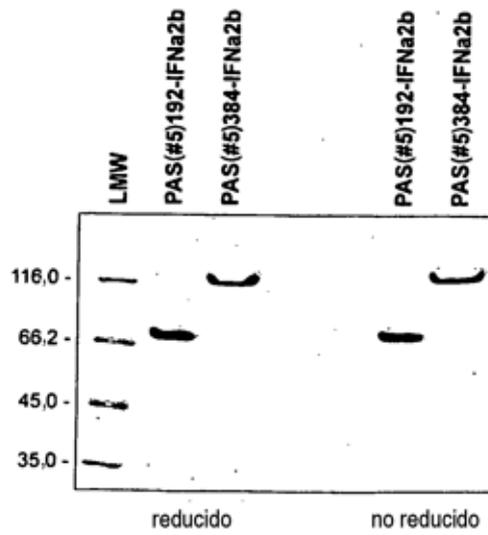


Figura 4

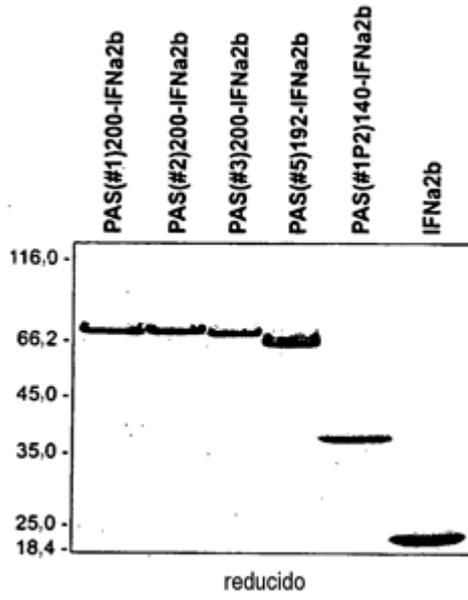
**A**



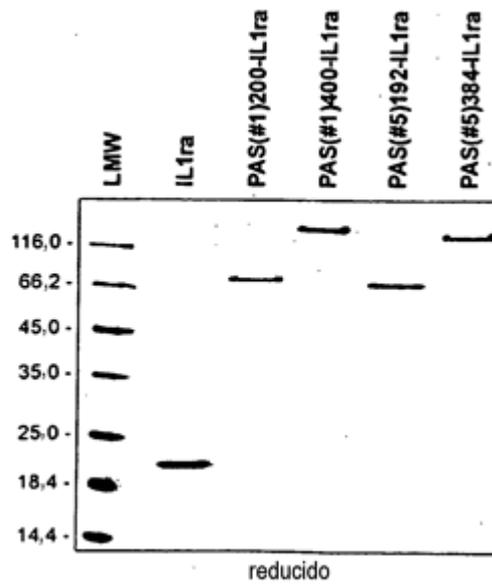
**B**



C



D



**F**

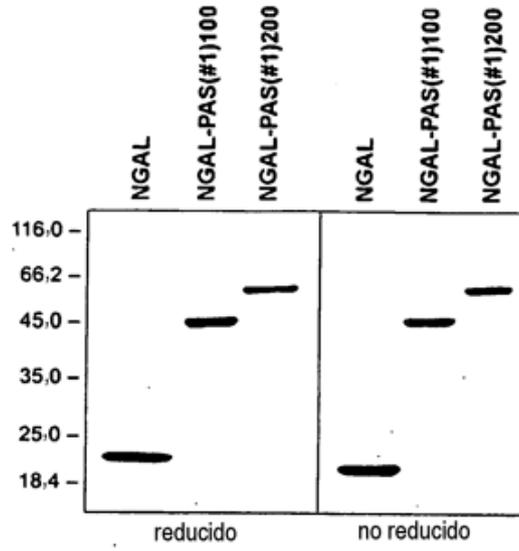
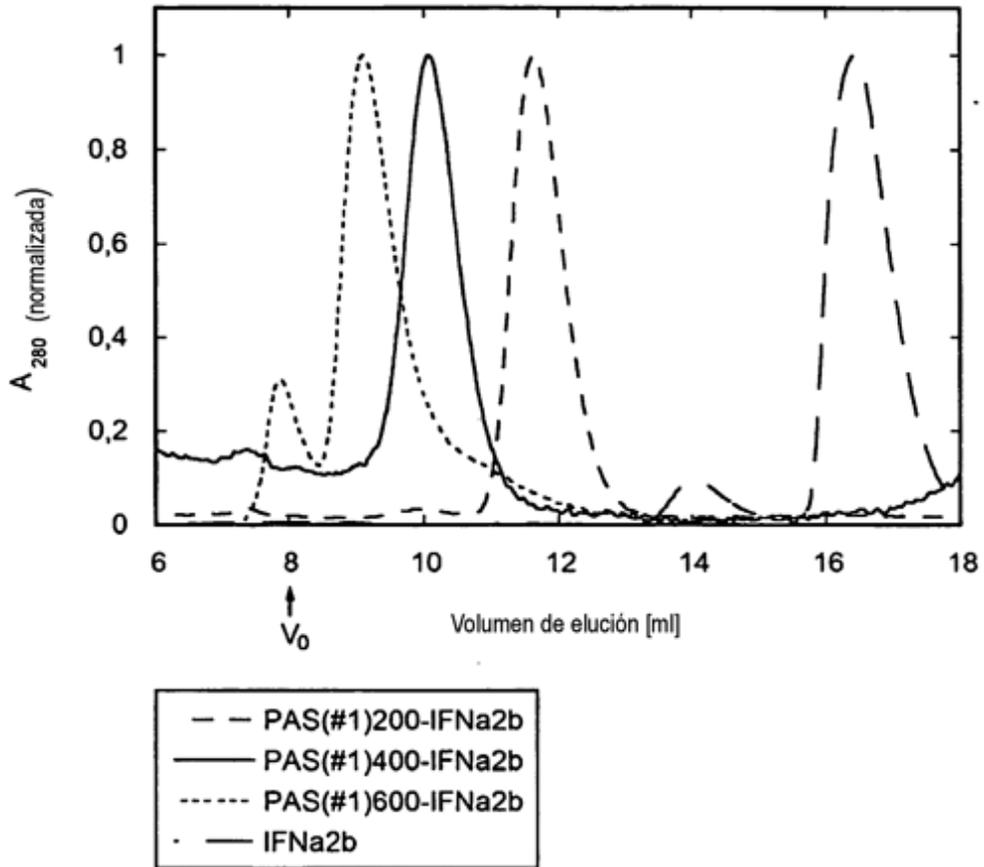
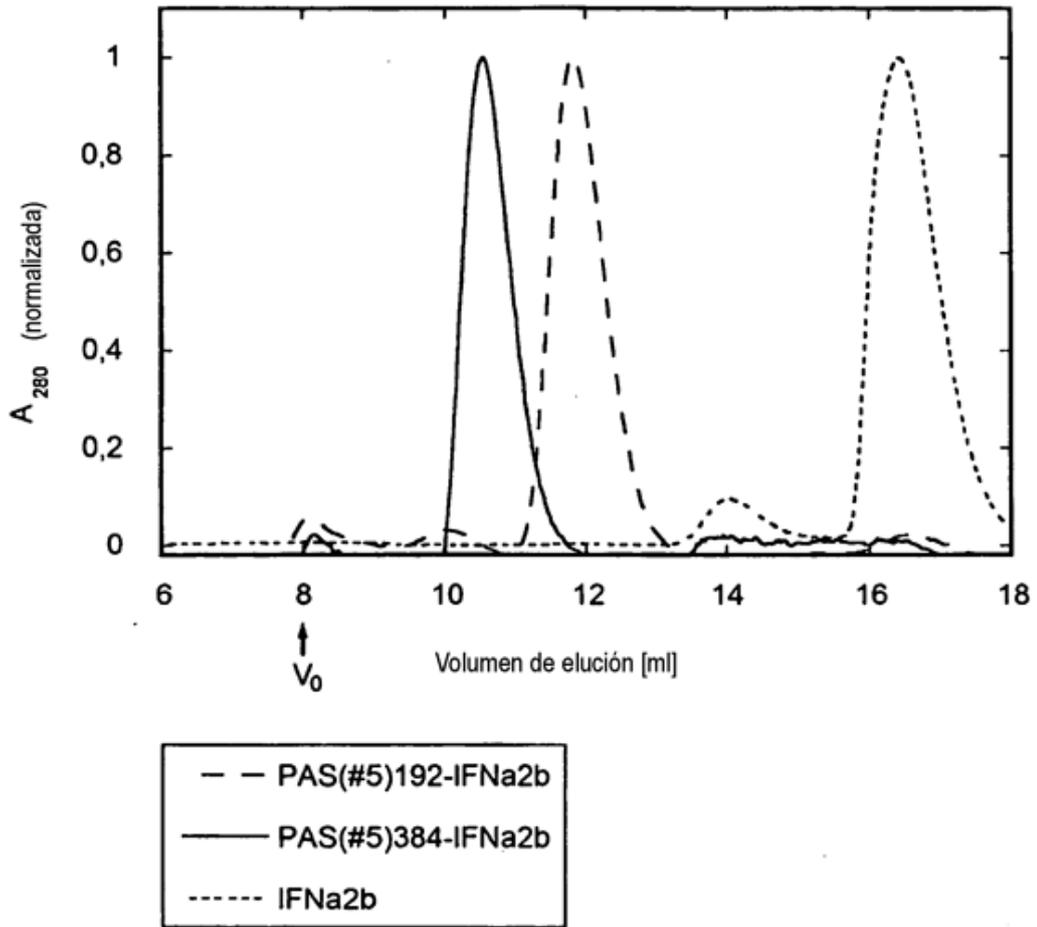


Figura 5

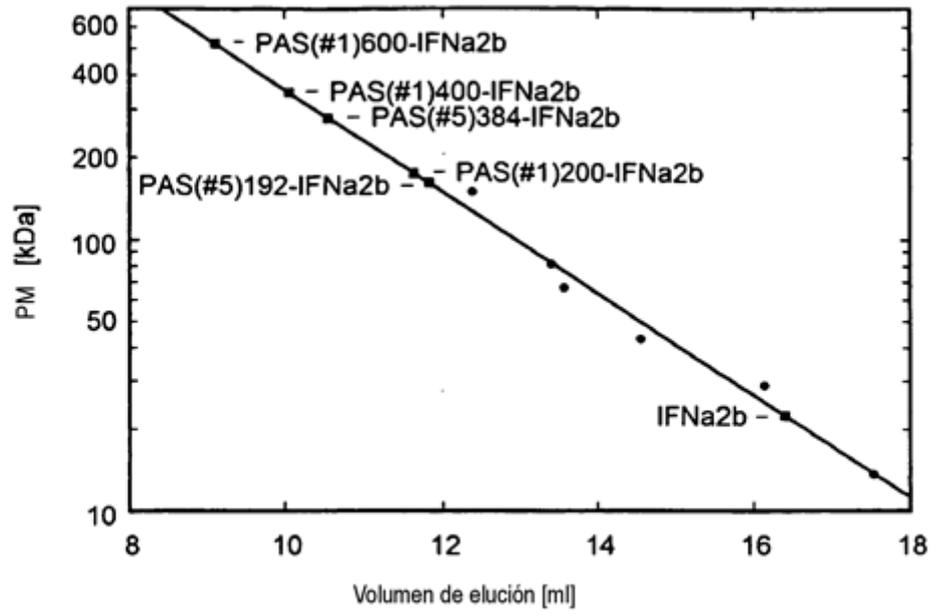
A.



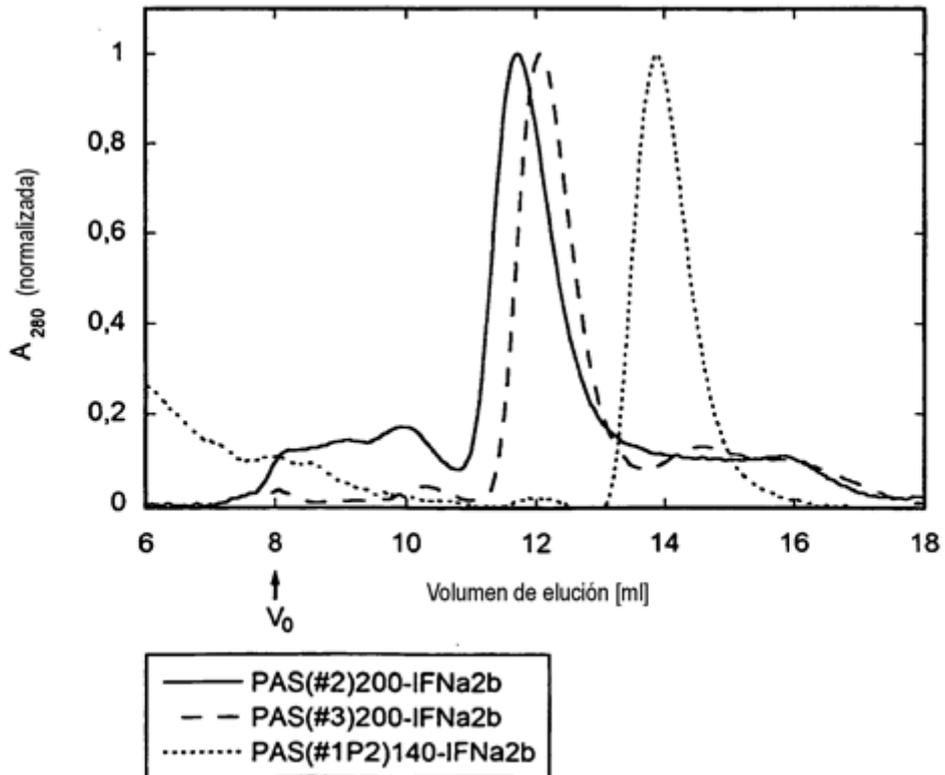
**B**



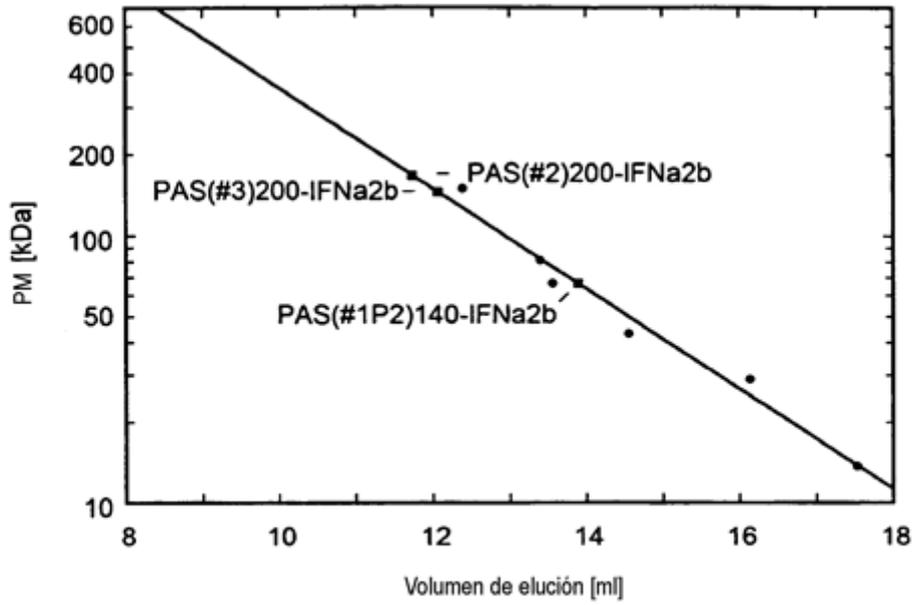
**C**



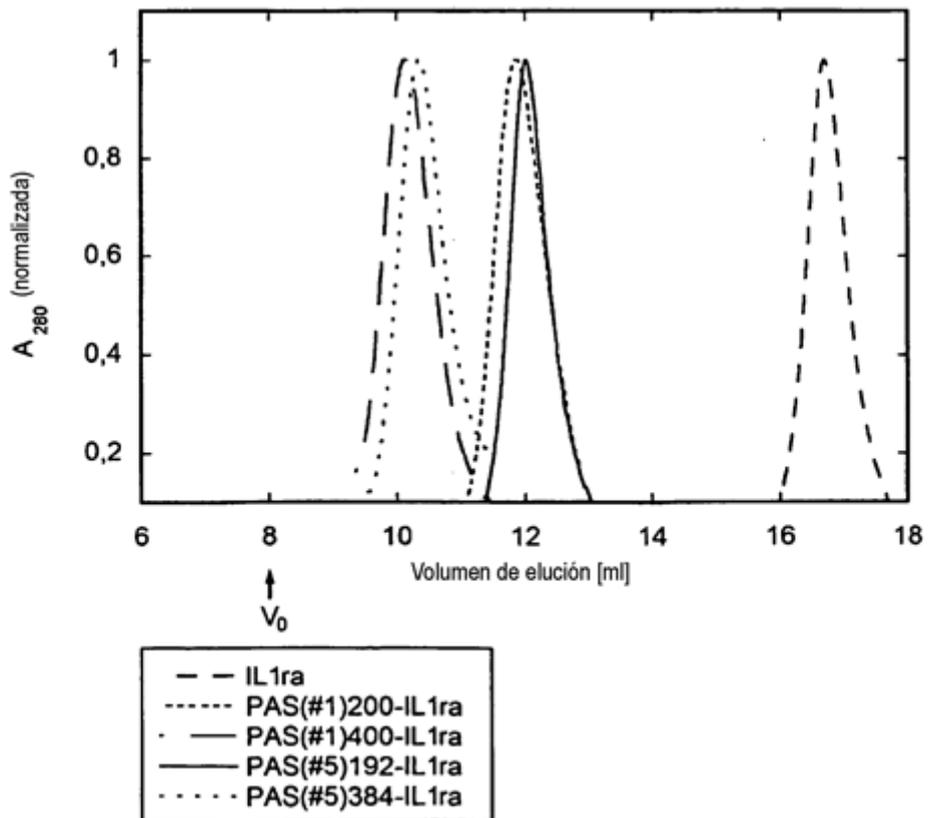
**D**



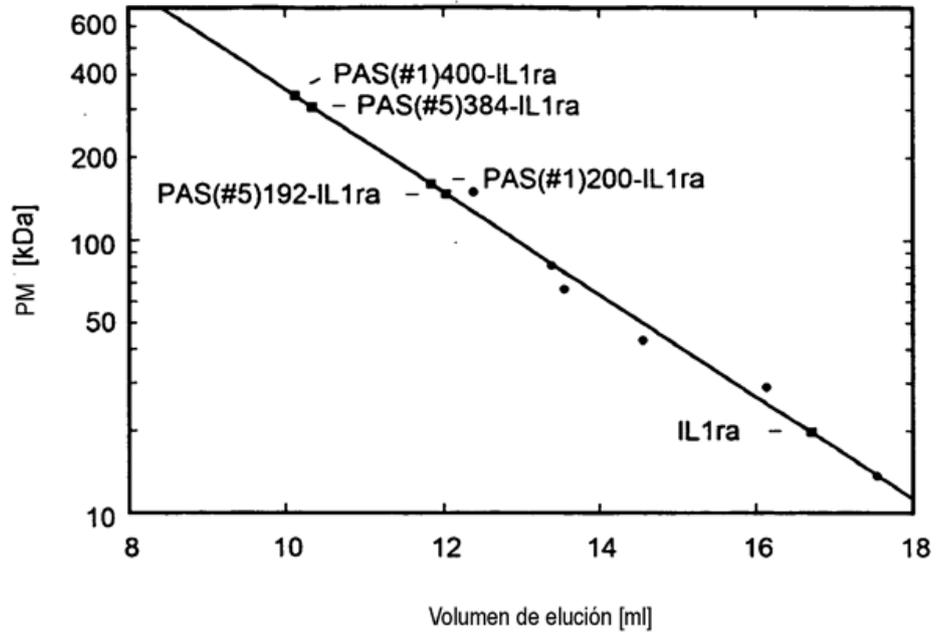
**E**



**F**

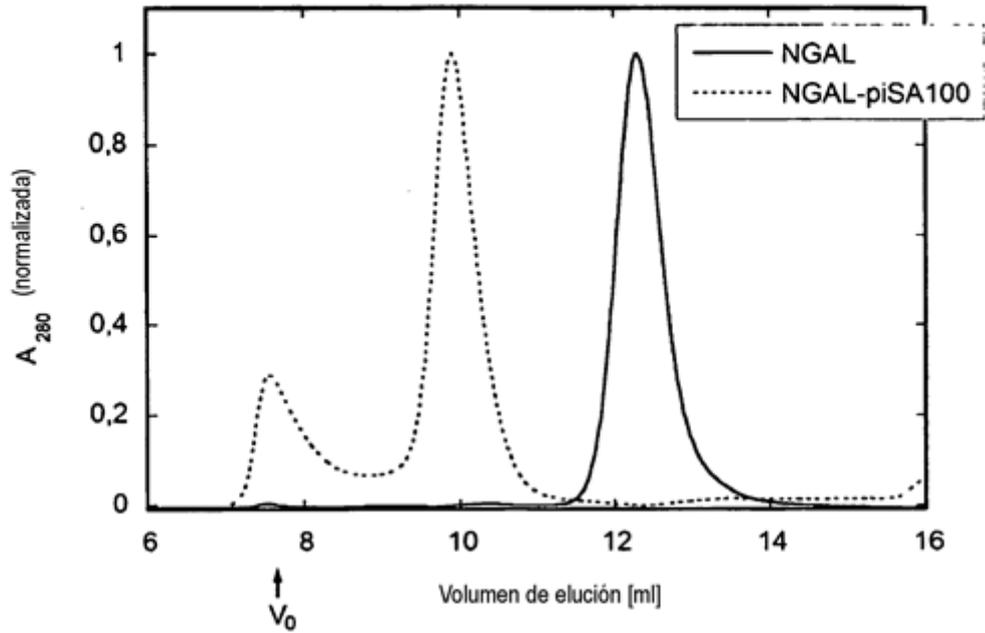


**G**

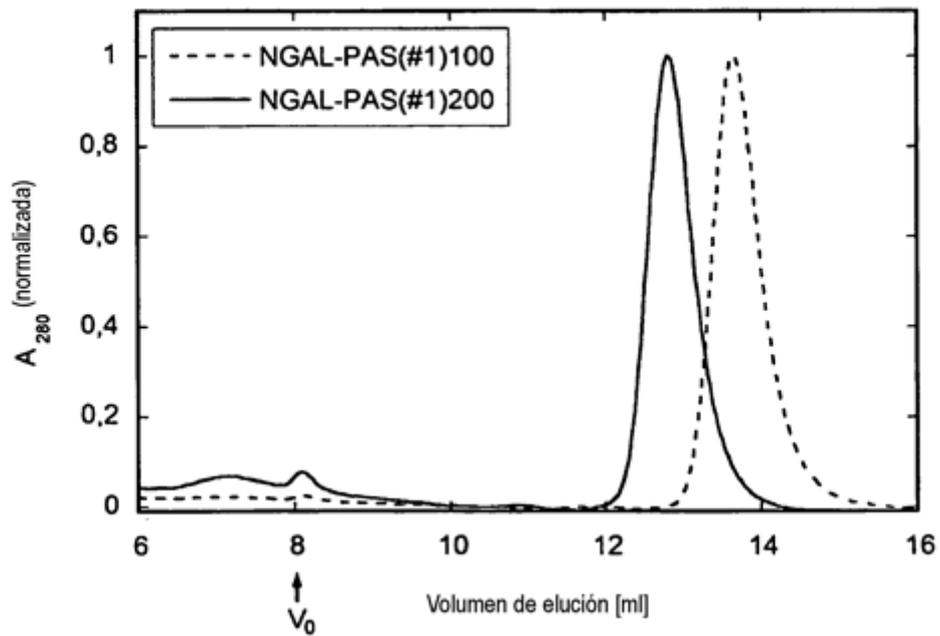


**H**

Superdex S75:

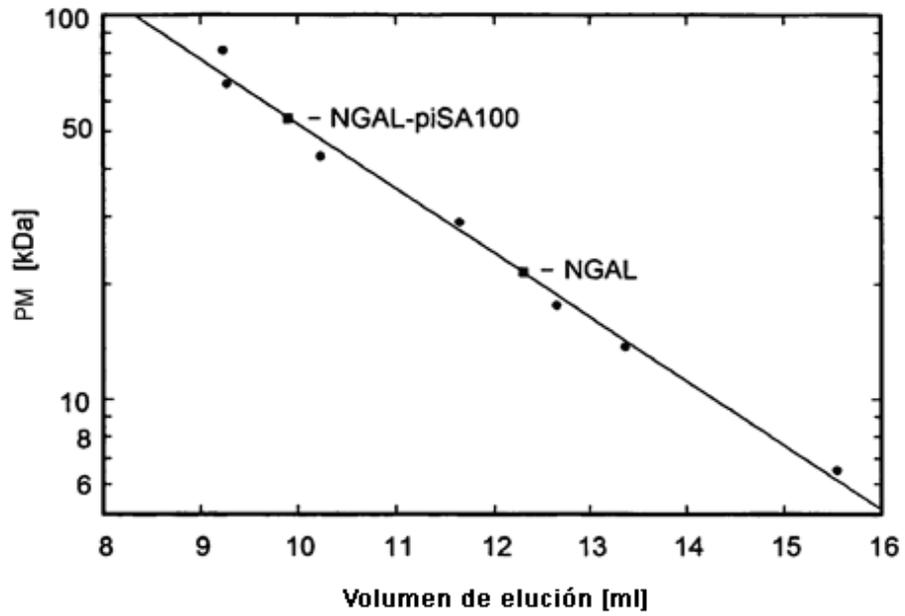


Superdex S200:



I

Superdex S75:



Superdex S200:

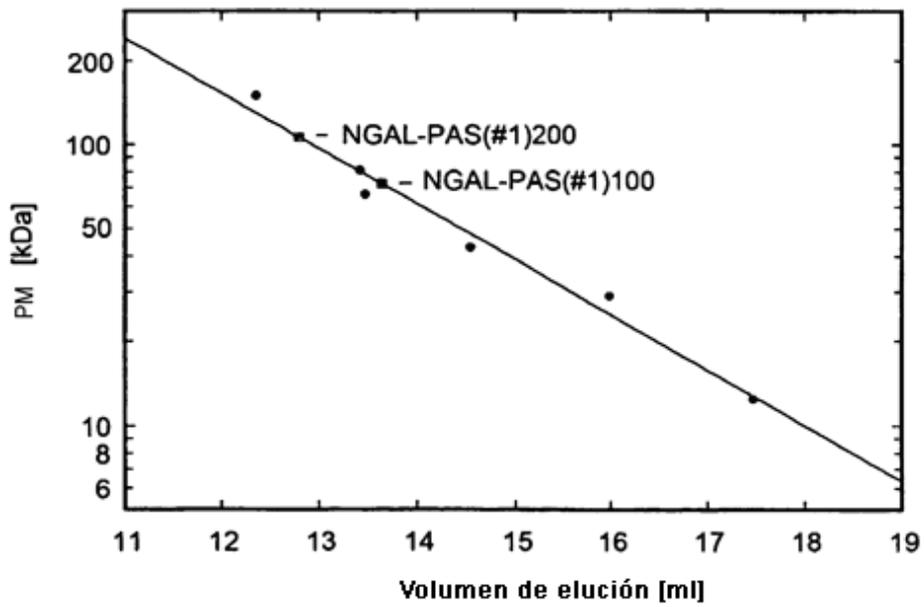
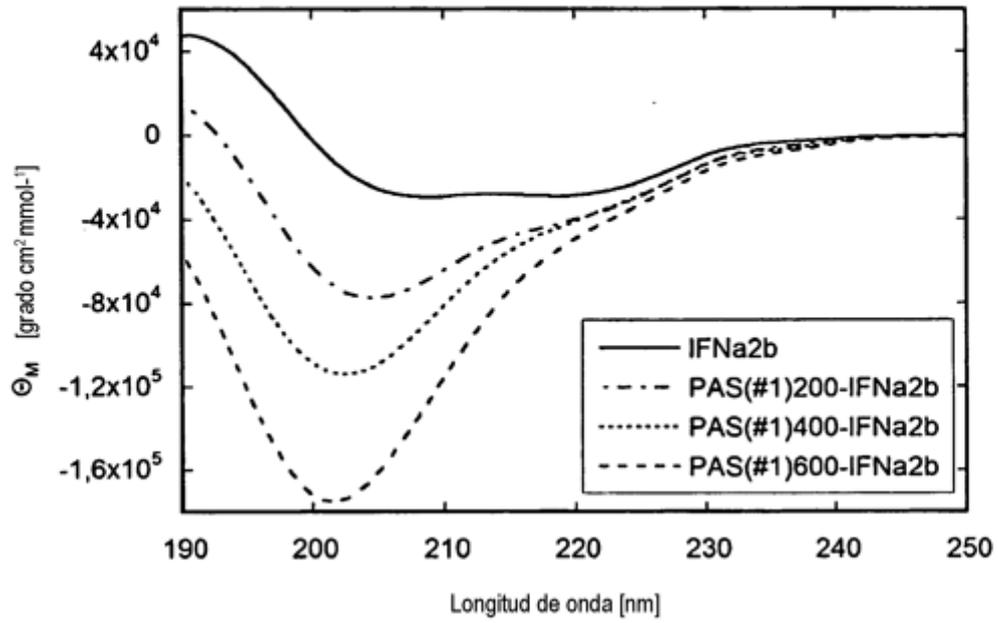
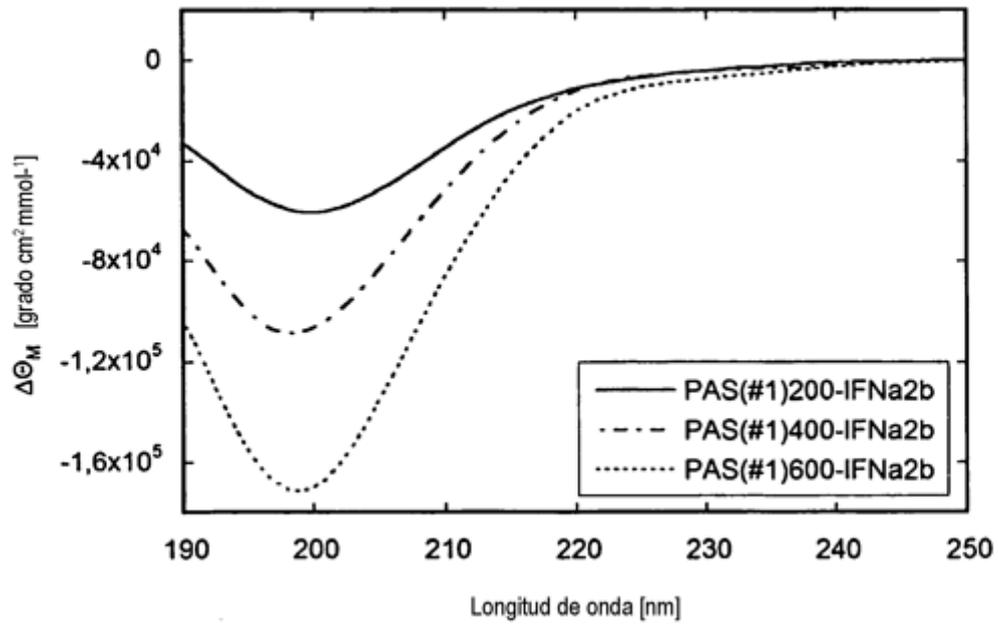


Figura 6

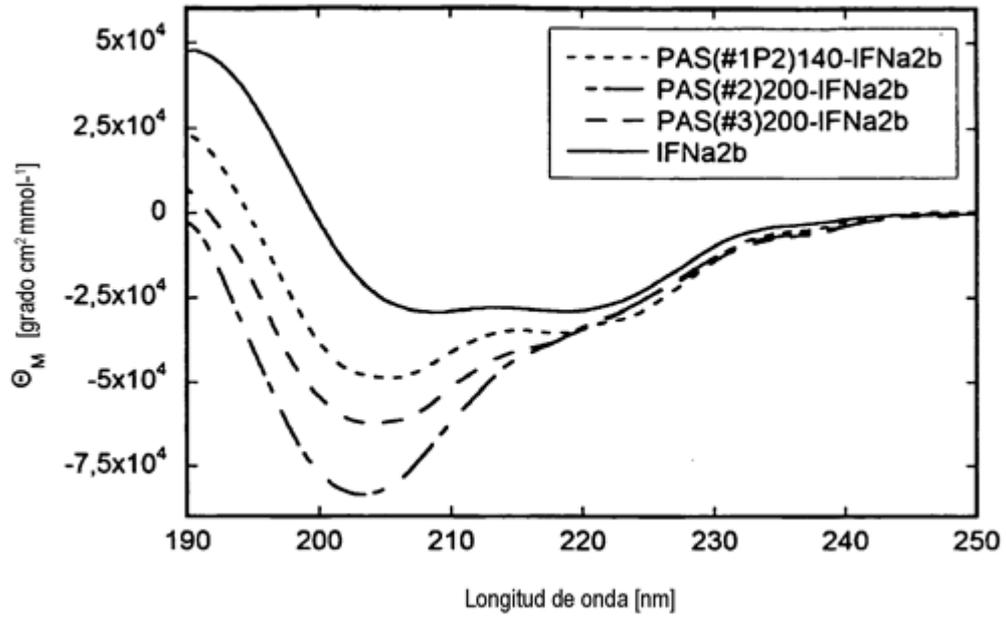
A



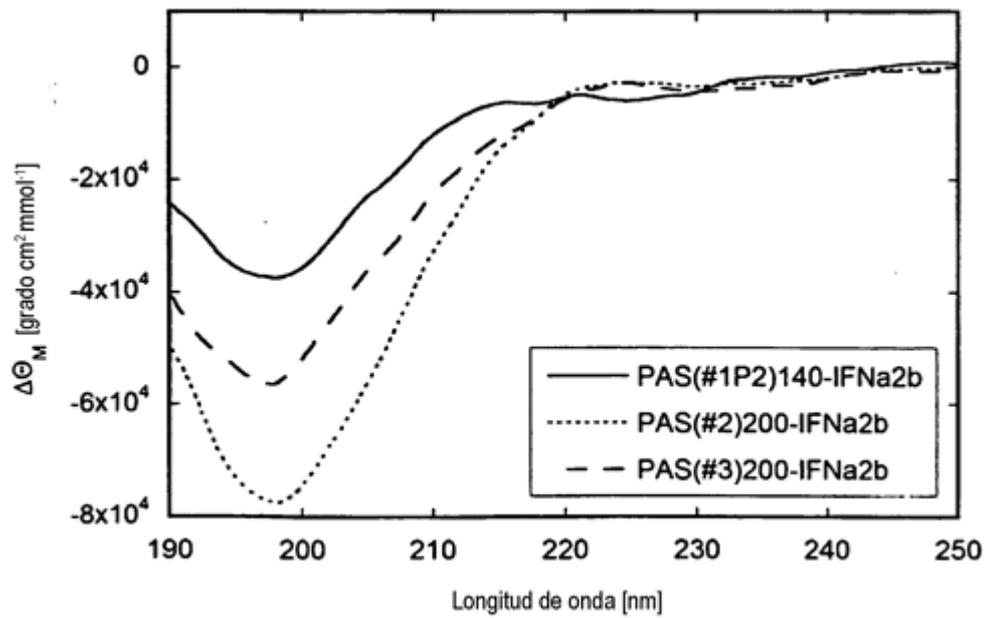
B



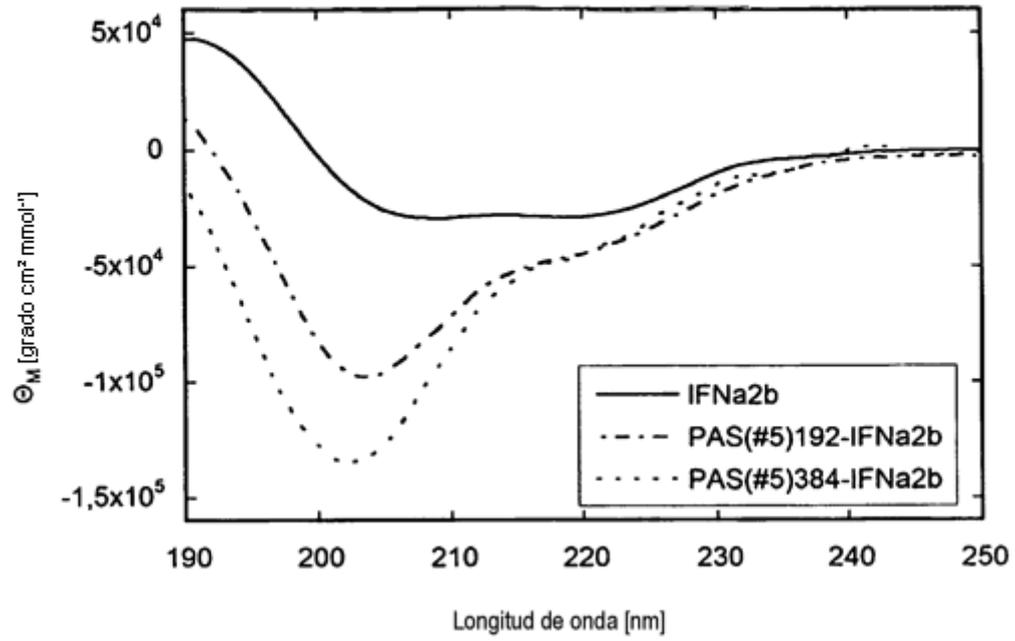
C



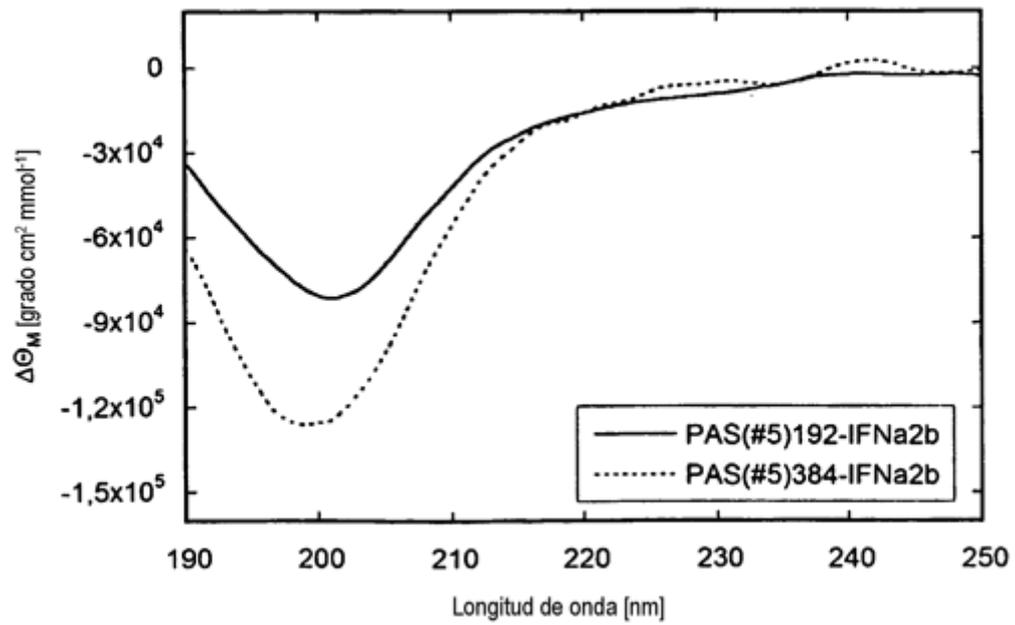
D



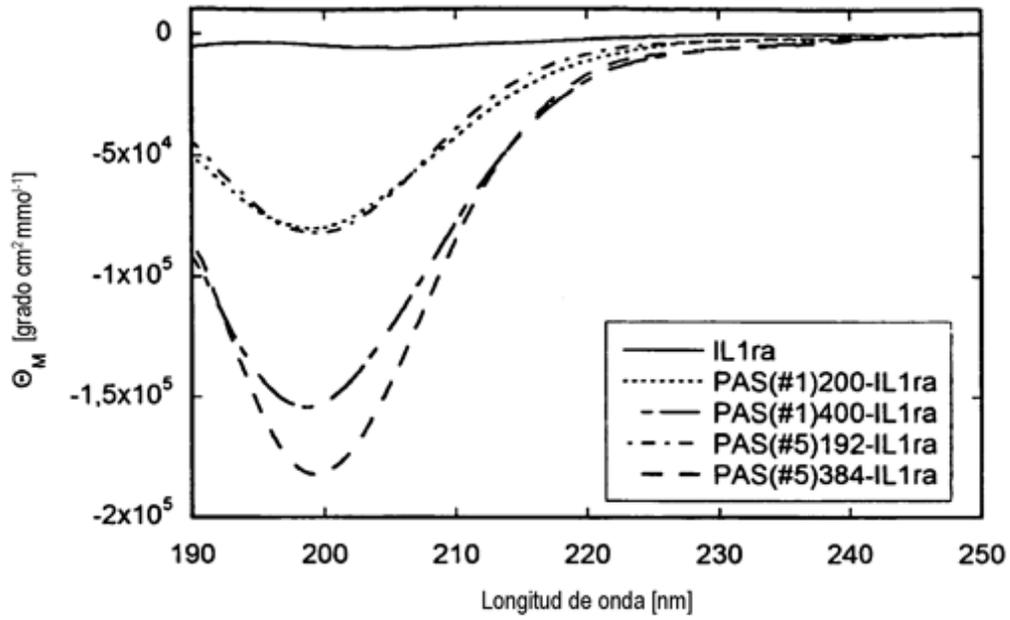
**E**



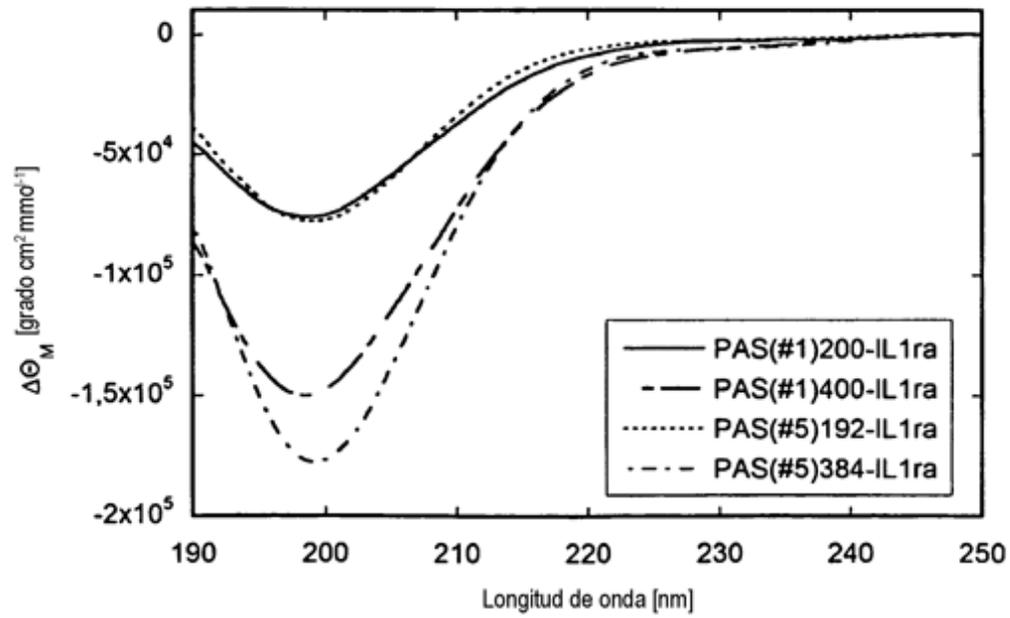
**F**



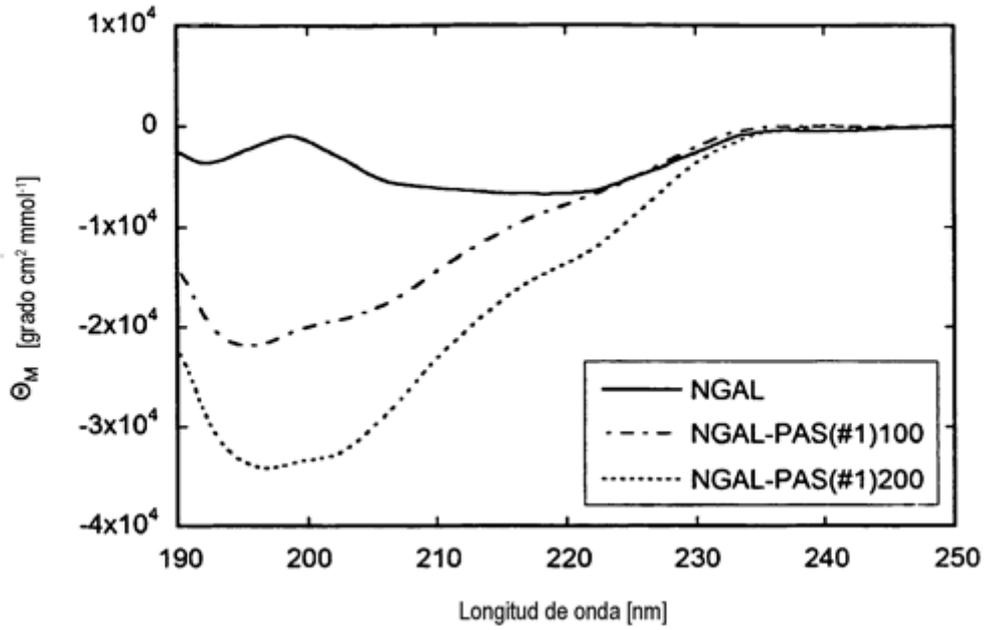
**G**



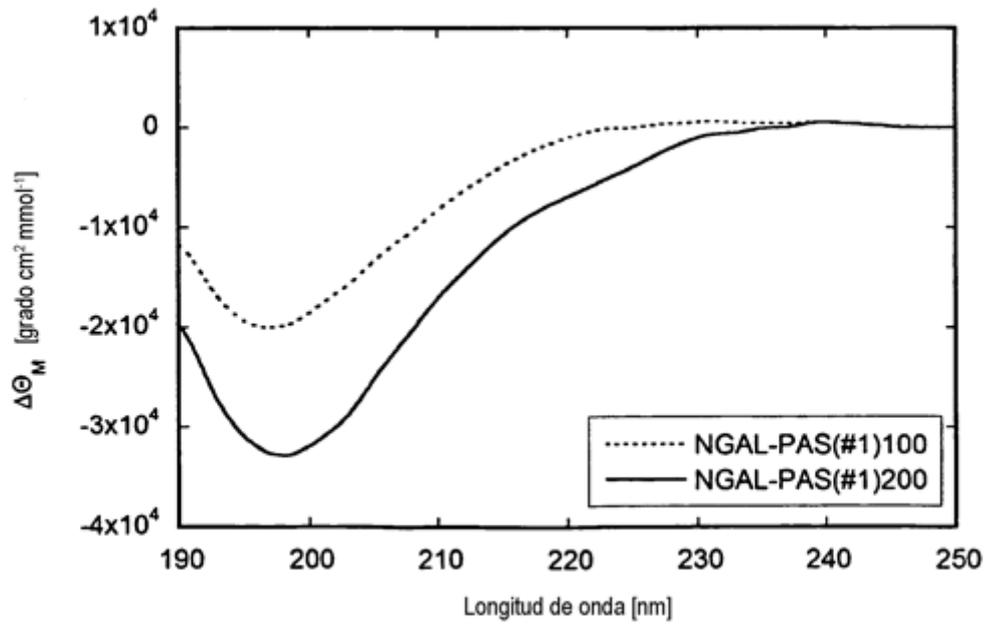
**H**



I



J



K

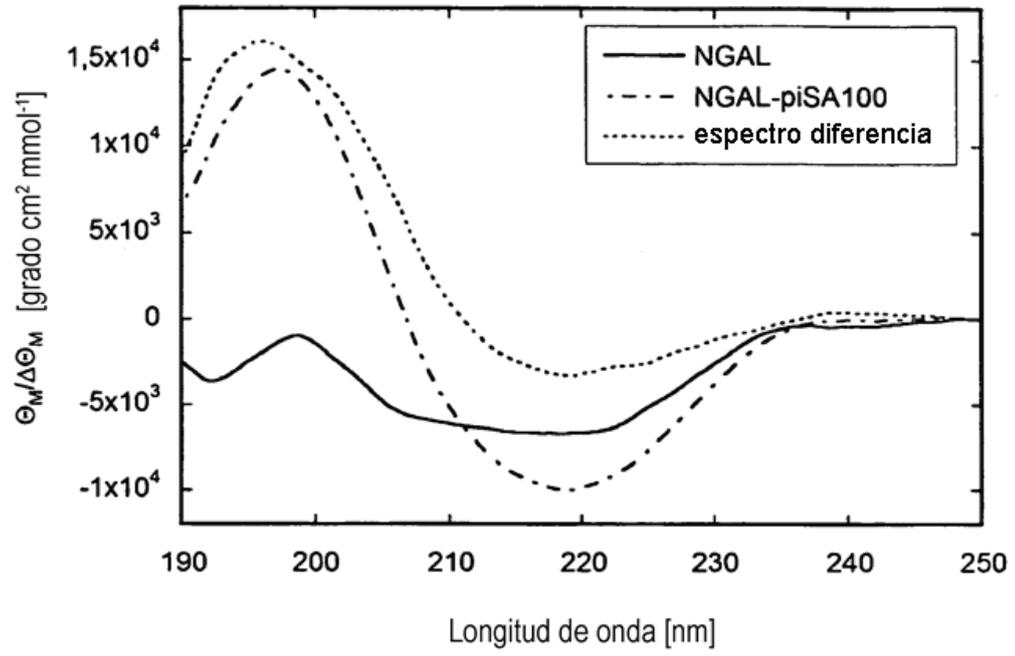
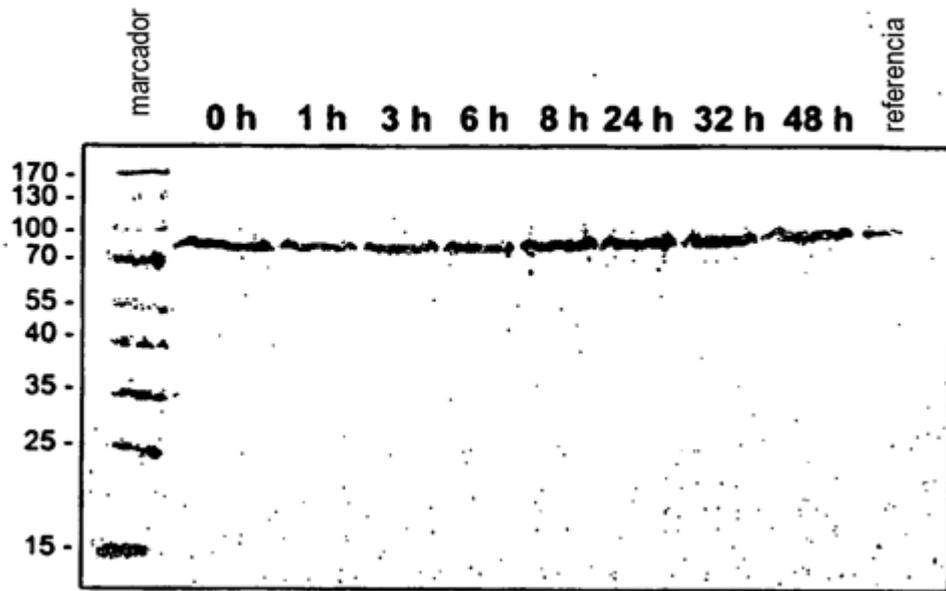


Figura 7

A



B

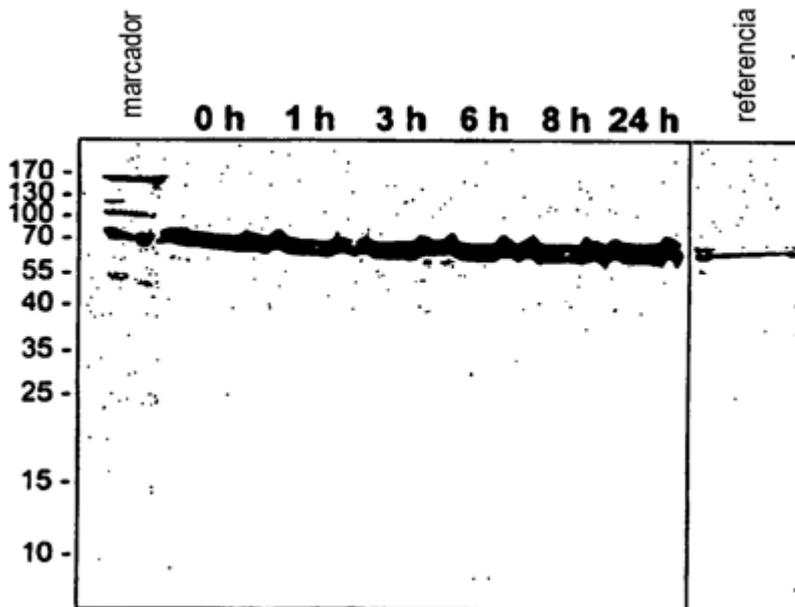


Figura 8

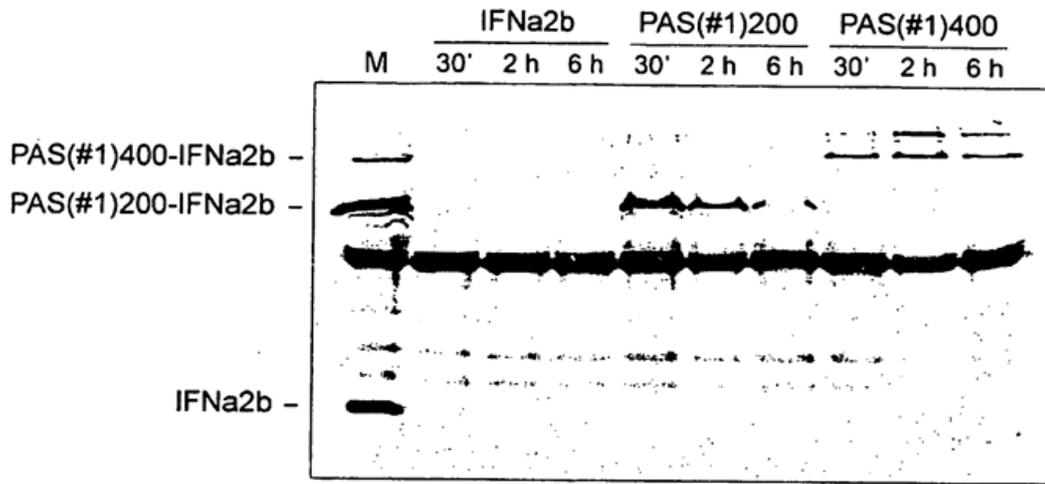


Figura 9

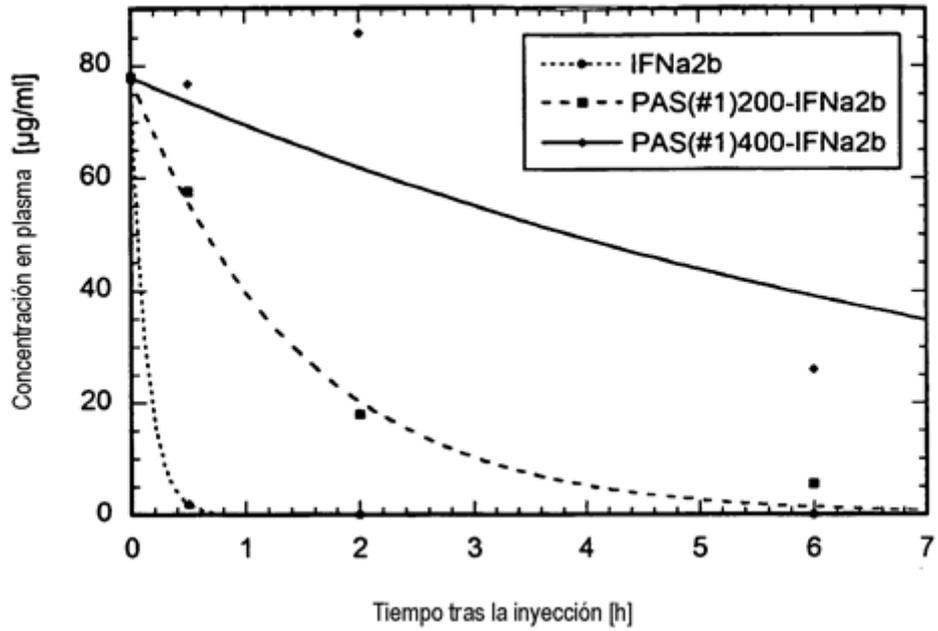


Figura 10

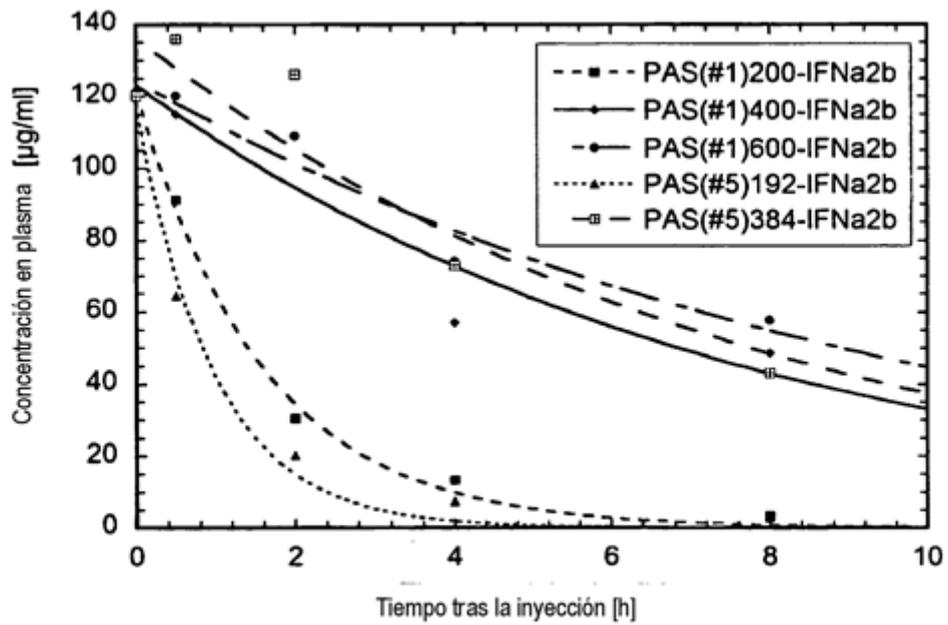
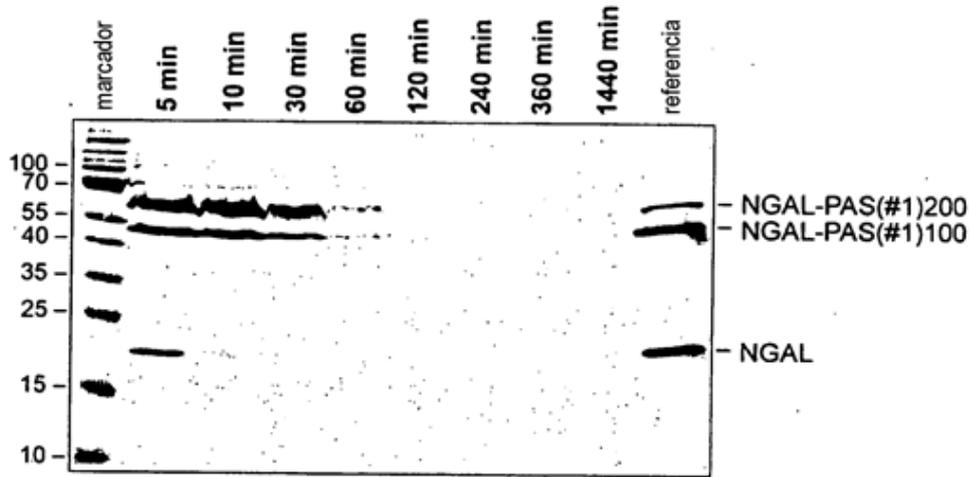


Figura 11

**A**



**B**

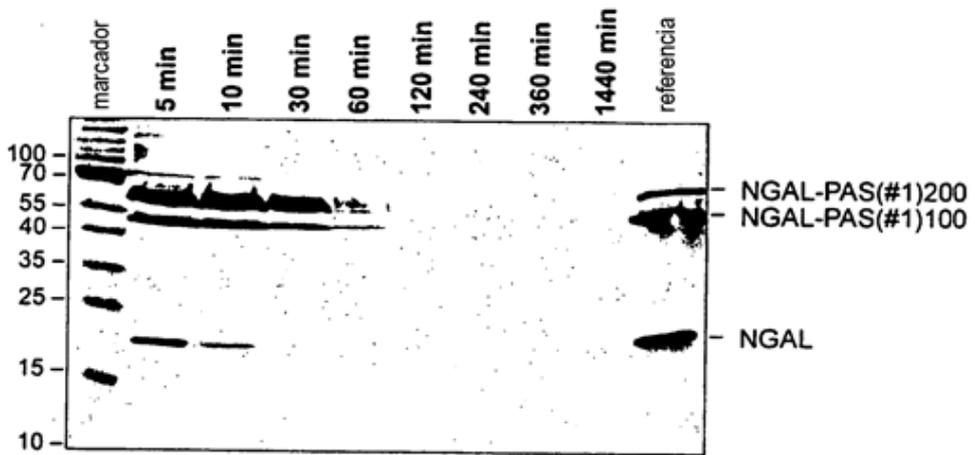


Figura 12

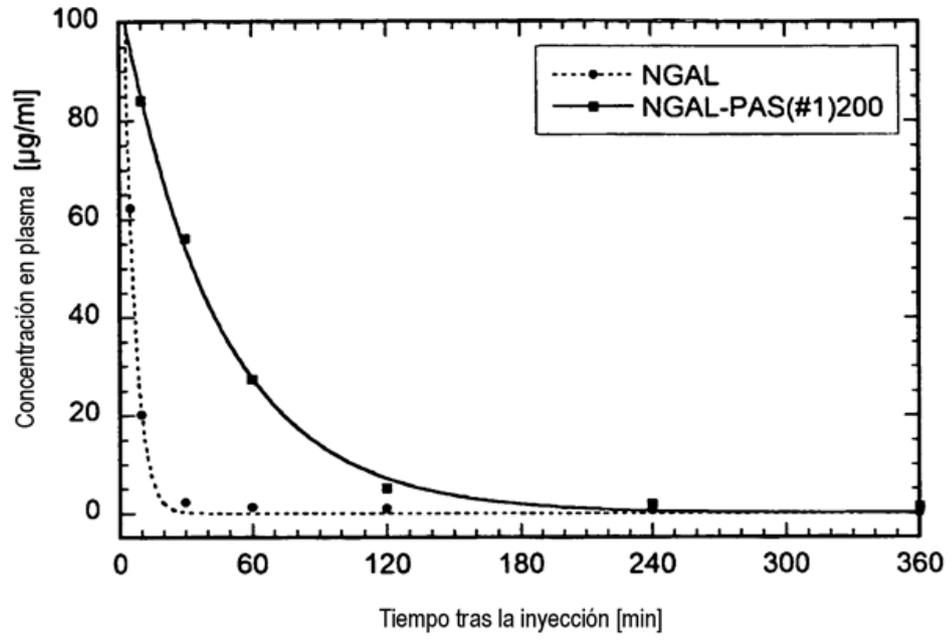
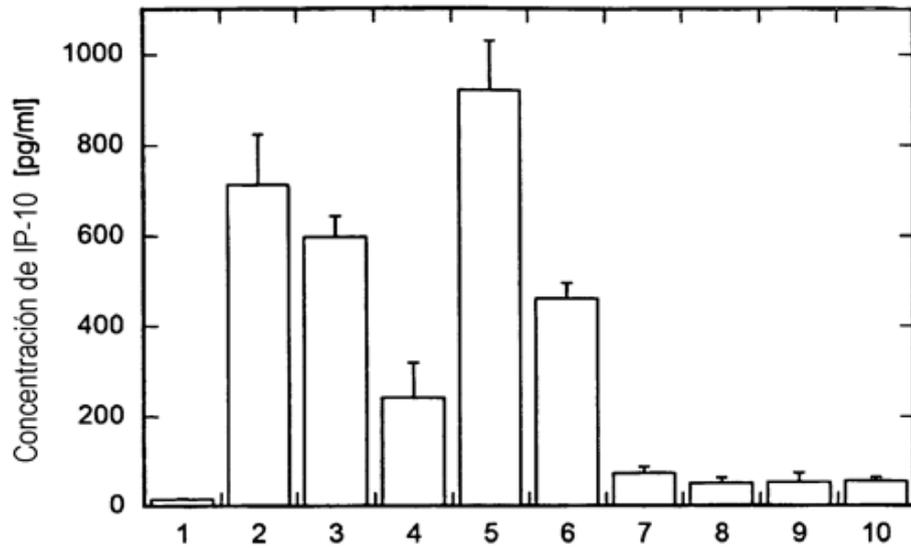


Figura 13



- 1: Células no estimuladas
- 2: IntronA 3850 ng/ml
- 3: IntronA 38,5 ng/ml
- 4: IntronA 0,385 ng/ml
- 5: PAS(#1)200-IFNa2b 3850 ng/ml
- 6: PAS(#1)200-IFNa2b 38,5 ng/ml
- 7: PAS(#1)200-IFNa2b 0,385 ng/ml
- 8: Fab (control negativo) 3850 ng/ml
- 9: Fab (control negativo) 38,5 ng/ml
- 10: Fab (control negativo) 0,385 ng/ml

Figura 14

**pISA:**

Gráfico de Chou – Fasma de @, 60 aa;  
CONSULTA

```

Hélice  AAAASSASSASSSSSSAAAASAAAAASSASSASSSSSSAAAASAAAAASSASSASSSSSSAAAASA
hoja    <----->
giro    T T T T T T
Totales de residuos : H: 59 E: 0 T: 6
porcentaje : H: 98.3 E: 0.0 T: 10.0
    
```

**PAS#1:**

Gráfico de Chou – Fasma de @, 60 aa;  
CONSULTA

```

Hélice  ASPAAPAPASPAAPAPSAPAASPAPAPASPAAPAPSAPAASPAPAPASPAAPAPSAPA
hoja    <-----> <-----> <----->
giro    T
Totales de residuos : H: 31 E: 0 T: 1
porcentaje : H: 51.7 E: 0.0 T: 1.7
    
```

**PAS#5:**

Gráfico de Chou – Fasma de @, 72 aa;  
CONSULTA

```

Hélice  AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA
hoja    <-----> <-----> <-----> <-----> <----->
giro
Hélice  AASPAAPSAPPA
hoja    <----->
giro    T
Totales de residuos : H: 56 E: 0 T: 1
porcentaje : H: 77.8 E: 0.0 T: 1.4
    
```