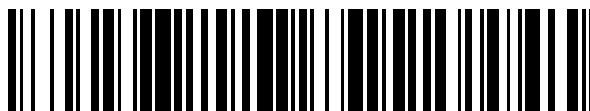


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 390**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2007 E 07749922 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2001903**

54 Título: **Polipéptidos de larga duración de acción y procedimientos para producirlos y administrarlos**

30 Prioridad:

03.02.2006 US 764761 P

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

16.07.2014

73 Titular/es:

**OPKO BIOLOGICS LTD (100.0%)
7 Golda Meir Street, 2nd floor
74140 Nes Ziona, IL**

72 Inventor/es:

**FARES, FUAD y
FIMA, UDI EYAL**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 477 390 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

Polipéptidos de larga duración de acción y procedimientos para producirlos y administrarlos

5

CAMPO DE LA INVENCION

Se divulgan un polipéptido y polinucleótidos que codifican los mismos péptidos con carboxilo terminal (PCT) de gonadotropina coriónica unido a un péptido de interés. También se divulgan las composiciones farmacéuticas que comprenden al polipéptido y los polinucleótidos de la invención y los métodos para usarlos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los polipéptidos son susceptibles a la desnaturalización o degradación enzimática en la sangre, hígado o riñón. En consecuencia, los polipéptidos, generalmente, tienen semividas de circulación cortas de varias horas. Debido a su baja estabilidad, los medicamentos con péptidos, generalmente, se suministran con una frecuencia prolongada a fin de mantener una concentración plasmática eficaz del péptido activo. Además, debido a que los medicamentos con péptidos, generalmente, se suministran por infusión, la inyección frecuente de medicamentos con péptidos ocasionan un malestar considerable al sujeto. Por lo tanto, existe la necesidad de tecnologías que prolonguen las semividas de polipéptidos terapéuticos al mismo tiempo que mantengan una alta eficacia farmacológica de estos. Tales medicamentos con péptidos deseados también deberían cumplir con los requisitos de contar con una estabilidad mejorada del suero, alta actividad y baja probabilidad de inducir una respuesta inmunológica indeseada al inyectarlos en un sujeto.

15

20

25

30

Farmacocinéticas no favorables, como una semivida corta en suero, pueden prevenir el desarrollo farmacéutico de muchos medicamentos candidatos prometedores. La semivida en suero es una característica empírica de una molécula y debe determinarse experimentalmente para cada nuevo medicamento potencial. Por ejemplo, los medicamentos de polipéptido con peso molecular inferior, mecanismos fisiológicos de depuración como la filtración renal pueden hacer que el mantenimiento de niveles terapéuticos de un medicamento no sea factible debido al costo o la frecuencia del régimen de dosis requerido. En cambio, la semivida larga en suero no es deseable cuando un medicamento o sus metabolitos tienen efectos secundarios tóxicos.

35

EE.UU. 5.759.818 divulga péptidos y proteínas modificados que cuentan con actividad biológica, los que contienen extensiones que representan el péptido con carboxilo terminal de gonadotropina coriónica humana o fragmentos de estos. Dichos péptidos y proteínas modificados cuentan con propiedades de depuración más deseables en comparación con los péptidos o proteínas sin modificar correspondientes.

RESUMEN DE LA INVENCION

40

En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido que consiste de una primera secuencia PCT AA (aminoácido) de gonadotropina coriónica unida al extremo amino-terminal de una secuencia de interés del péptido, y una segunda y tercera secuencia PCT AA unida al extremo carboxi-terminal de la secuencia de interés del péptido, donde la secuencia de interés del péptido es un péptido de eritropoyetina (EPO), en donde el PCT es de una subunidad beta de la gonadotropina coriónica, en donde el PCT consiste de la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, y en donde el péptido EPO estimula la eritropoyetina.

45

El péptido EPO de interés puede ser glicosilado o no glicosilado.

El péptido EPO puede componerse de la secuencia de aminoácidos N.º ID SEC: 3 o N.º ID SEC: 6.

50

Al menos uno de los péptidos con carboxilo terminal de gonadotropina coriónica puede componerse de la secuencia de aminoácidos de N.º ID SEC: 17 o N.º ID SEC: 18.

Al menos uno de los péptidos con carboxilo terminal de gonadotropina coriónica puede estar truncado y componerse de al menos un sitio de glicosilación.

Al menos uno de los péptidos con carboxilo terminal de gonadotropina coriónica puede estar glicosilado.

55

El polipéptido puede además componerse de un péptido de señal, y el péptido de señal puede componerse de la secuencia de aminoácidos N.º ID SEC: 19.

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención. El polinucleótido puede componerse de la secuencia de aminoácido N.º ID SEC: 21.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un vector de expresión que se compone del polinucleótido de la invención.

5 En una realización adicional, la presente invención proporciona una célula que se compone del vector de expresión de la invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que se compone de un polipéptido, polinucleótido, vector de expresión o célula de la invención.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un método para mejorar la semivida biológica y retener una actividad biológica de una secuencia de interés del péptido; el método se compone del paso de unir una primera secuencia PCT AA de gonadotropina coriónica al extremo amino-terminal de una secuencia de interés del péptido y unir una segunda y tercera secuencia PCT AA al extremo carboxi-terminal de la secuencia de interés del péptido, lo que mejora, por lo tanto, la semivida biológica del péptido de interés, en donde el péptido de interés es eritropoyetina (EPO), en donde el PCT es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana, en donde el PCT consiste de la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS y en donde el péptido EPO estimula la eritropoyesis.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido o un polinucleótido de la invención y lo usa en el tratamiento o la reducción de la incidencia asociada con anemia en un sujeto.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIAGRAMAS**

Las Figuras 1A-1 F son diagramas que ilustran seis conceptos EPO-PCT.

La Figura 1A - es un diagrama del polipéptido del N.º ID SEC: 1

La Figura 1B es un diagrama del polipéptido del N.º ID SEC: 2

25 La Figura 1C es un diagrama de un polipéptido del N.º ID SEC: 3 La Figura 1D es un diagrama de un polipéptido de N.º ID SEC: 4.

La Figura 1E es un diagrama de un polipéptido de N.º ID SEC: 5.

La Figura 1F es un diagrama de un polipéptido del N.º ID SEC: 6.

30 La Figura 2 es una fotografía que ilustra la expresión de las variantes EPO-PCT de las células DG44 transfectadas. Las muestras del ensayo final de las células transfectadas se prepararon como se describe en "preparación de muestra" y se ejecutaron en SDS/PAGE. Las proteínas se detectaron por Western Blot.

35 La Figura 3 es una gráfica que ilustra la bioactividad *in vivo* de los derivados hEPO recombinantes y EPO-3 (N.º ID SEC: 3). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una sola inyección IV/semana (15 mg/kg) durante tres semanas de EPO-3, rhEPO-WT (N.º ID SEC: 16), Recormon (EPO comercial) o Recormon (5 mg/kg) 3 veces a la semana. Los animales de control se inyectaron IV con PBS. Se recolectaron muestras de sangre tres veces a la semana, y se detectaron niveles de hematocrito. Cada punto representa el grupo promedio de hematocrito (%) \pm SE.

40 La Figura 4 es una gráfica que ilustra la bioactividad *in vivo* de los derivados hEPO recombinantes y EPO-1 (N.º ID SEC: 1). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una sola inyección IV/semana (15 mg/kg) durante tres semanas de EPO-1, rhEPO-WT (N.º ID SEC: 16), Recormon o Recormon (5 mg/kg) 3 veces a la semana. Los animales de control se inyectaron IV con PBS. Se recolectaron muestras de sangre tres veces a la semana, y se detectaron niveles de hematocrito. Cada punto representa el grupo promedio de hematocrito (%) \pm SE.

45 La Figura 5 es una gráfica que ilustra la bioactividad *in vivo* de los derivados hEPO recombinantes y EPO-2 (N.º ID SEC: 2). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una sola inyección IV/semana (15 mg/kg) durante tres semanas de EPO-2 (N.º ID SEC: 2), rhEPO-WT (N.º ID SEC: 16), Recormon o Recormon (5 mg/kg) 3 veces a la semana. Los animales de control se inyectaron IV con PBS. Se recolectaron muestras de sangre tres veces a la semana, y se detectaron niveles de hematocrito. Cada punto representa el grupo promedio de hematocrito (%) \pm SE.

50 La Figura 6 es una gráfica de tiempo que ilustra el cambio en el nivel de reticulocitos después de una sola dosis bolo de EPO-0 (N.º ID SEC: 16), EPO-3 (N.º ID SEC: 3) y Aranesp.

55 La Figura 7 es una gráfica de tiempo que ilustra el cambio en el nivel de hemoglobina (presentado como un cambio desde la línea base) después de una sola dosis bolo de EPO-0 (N.º ID SEC: 16), EPO-3 (N.º ID SEC: 3) y Aranesp.

La Figura 8 es una gráfica de tiempo que ilustra el cambio en el nivel de hematocrito después de una sola dosis bolo de EPO-0 (N.º ID SEC: 16), EPO-3 (N.º ID SEC: 3) y Aranesp.

La Figura 9 es una gráfica que ilustra el cambio en concentración de suero de EPO-0 (N.º ID SEC: 16), EPO-3 (N.º ID SEC: 3) y Aranesp después de la inyección IV.

La Figura 10 es una gráfica Western Blot que ilustra el peso molecular y la identidad de MOD-4020 (N.º ID SEC: 36), MOD-4021 (N.º ID SEC: 37), MOD-4022 (N.º ID SEC: 38), MOD-4023 (N.º ID SEC: 39), MOD-4024 (N.º ID SEC: 40). El gel PAGE SDS se transfirió y tiñó usando anticuerpos monoclonales anti-hGH. La fotografía indica que, al igual que los hGH comerciales y de tipo silvestre, las variantes MOD-7020-4 son reconocidas por los anticuerpos anti hGH.

La Figura 11 es una gráfica de barras que ilustra el peso ganado de las ratas hipofisectomizadas después de la administración de los polipéptidos GH-PCT de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención describe polipéptidos de acción prolongada y métodos para producirlos y usarlos.

Los polipéptidos de acción prolongada se componen del péptido con carboxilo terminal (PCT) de la gonadotropina coriónica humana (GCh). En una realización, el PCT actúa como una protección contra la degradación de proteínas o péptidos derivados de este. En una realización, el PCT amplía las semividas circulatorias de las proteínas o péptidos derivados de este. En algunas realizaciones, el PCT mejora la potencia de las proteínas o péptidos derivados de este. En otra realización, el "péptido PCT", el "péptido con carboxilo terminal" y la "secuencia PCT" se utilizan intercambiamente en la presente. En otra realización, el péptido con carboxilo terminal es un PCT de longitud completa. En otra realización, el péptido con carboxilo terminal es un PCT truncado. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el "péptido EPO" y la "secuencia EPO" se utilizan intercambiamente en la presente. En otra realización, el péptido EPO es una proteína EPO. En otra realización, el péptido con carboxilo terminal es una proteína EPO truncada. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la "secuencia de señal" y el "péptido de señal" se utilizan intercambiamente en la presente. En otra realización, cuando se utiliza la "secuencia" en referencia a un polinucleótido, puede referirse a una porción de codificación. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el "péptido de interés" y la "secuencia de interés del polipéptido" se utilizan intercambiamente en la presente. En otra realización, el péptido de interés es una proteína de longitud completa. En otra realización, el péptido de interés es un fragmento de proteína. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Se divulga un polipéptido compuesto de al menos dos secuencias de péptidos con carboxilo terminal (PCT) de gonadotropina coriónica unidas a una secuencia de interés del polipéptido, en donde una primera secuencia PCT de al menos las últimas dos secuencias PCT están unidas a un extremo amino-terminal de la secuencia de interés del polipéptido, y una segunda secuencia PCT de al menos dos secuencias PCT está unida al extremo carboxi-terminal de la secuencia de interés del polipéptido. En otra realización, la secuencia del péptido con carboxilo terminal (PCT) es de gonadotropina coriónica humana.

En otra realización, el péptido con carboxilo terminal (PCT) está unido a la secuencia de interés del polipéptido a través de un ligador. En otra realización, el ligador que conecta la secuencia PCT a la secuencia de interés del polipéptido es un enlace covalente. En otra realización, el ligador que conecta la secuencia PCT a la secuencia de interés del polipéptido es un enlace péptido. En otra realización, el ligador que conecta la secuencia PCT a la secuencia de interés del polipéptido es un enlace péptido sustituido.

La frase "secuencia de interés del polipéptido" se refiere a péptidos de eritropoyetina (EPO) que se componen de una actividad biológica. En otra realización, el péptido es glicosilado. En otra realización, el péptido es no glicosilado.

En otra realización, el péptido con carboxilo terminal (PCT) de gonadotropina coriónica humana (GCh) está fusionado a EPO o a un derivado péptido de EPO.

Se divulga que las secuencias PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido y en el extremo carboxi-terminal del polipéptido proporcionan una protección mejorada contra la degradación de una proteína. En algunas realizaciones, las secuencias PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido y en el extremo carboxi-terminal del polipéptido proporcionan una semivida mayor de la proteína unida.

En algunas realizaciones, una secuencia PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido, una secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal del polipéptido y al menos una secuencia PCT adicional

- unida conjuntamente a la secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal proporcionan una protección mejorada contra la degradación de una proteína. En algunas realizaciones, una secuencia PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido, una secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal del polipéptido y al menos una secuencia PCT adicional unida conjuntamente a la secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal proporcionan una semivida más amplia de la proteína unida. En algunas realizaciones, una secuencia PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido, una secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal del polipéptido y al menos una secuencia PCT adicional unida conjuntamente a la secuencia PCT en el término de carboxi proporcionan una actividad mejorada de la proteína unida.
- Se divulga en la presente que una secuencia PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido, una secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal del polipéptido y al menos una secuencia PCT adicional unida conjuntamente a la secuencia PCT en el extremo amino-terminal proporcionan una protección mejorada contra la degradación de la proteína unida.
- También se divulga que una secuencia PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido, una secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal del polipéptido y al menos una secuencia PCT adicional unida conjuntamente a la secuencia PCT en el extremo amino-terminal proporcionan una semivida más amplia de la proteína unida. Adicionalmente, se divulgó que una secuencia PCT en el extremo amino-terminal de un polipéptido, una secuencia PCT en el extremo carboxi-terminal del polipéptido y al menos una secuencia PCT adicional unida conjuntamente a la secuencia PCT en el extremo amino-terminal proporcionan una actividad mejorada de la proteína unida.
- En otra realización, el péptido con carboxilo terminal (PCT) de la presente invención se compone de la secuencia de aminoácidos (AA) desde AA 112 hasta la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana como se prevé en el N.º ID SEC:17. En otra realización, la secuencia PCT de la presente invención se compone de la secuencia AA desde AA 118 hasta la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se prevé en el N.º ID SEC: 18. En otra realización, la secuencia PCT también comienza desde cualquier posición entre las posiciones 112 a 118 y termina en la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana. En algunas realizaciones, la secuencia PCT del péptido es 28, 29, 30,31, 32, 33 o 34 AA de largo y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia AA de PCT.
- En otra realización, el péptido PCT es una variante del PCT de la gonadotropina coriónica, la cual difiere del PCT nativo por 1 a 5 sustituciones conservadoras AA, como se describe en el patente de EE.UU. No.5.712.122. En otra realización, el péptido PCT es una variante del PCT de la gonadotropina coriónica, la cual difiere del PCT nativo por 1 sustitución conservadora. En otra realización, el péptido PCT es una variante del PCT de la gonadotropina coriónica, la cual difiere del PCT nativo por 2 sustituciones AA conservadoras. En otra realización, el péptido PCT es una variante del PCT de la gonadotropina coriónica, la cual difiere del PCT nativo por 3 sustituciones AA conservadoras. En otra realización, el péptido PCT es una variante del PCT de la gonadotropina coriónica, la cual difiere del PCT nativo por 4 sustituciones AA conservadoras. En otra realización, el péptido PCT es una variante del PCT de la gonadotropina coriónica, la cual difiere del PCT nativo por 5 sustituciones AA. En otra realización, la secuencia AA del péptido PCT de la presente invención es al menos 70% homóloga a la secuencia AA del PCT nativo o a un péptido de este. En otra realización, la secuencia AA del péptido PCT de la presente invención es al menos 80% homólogo a la secuencia AA del PCT nativo o a un péptido de este. En otra realización, la secuencia AA del péptido PCT de la presente invención es al menos 90% homólogo a la secuencia AA del PCT nativo o a un péptido de este. En otra realización, la secuencia AA del péptido PCT de la presente invención es al menos 95% homólogo a la secuencia AA del PCT nativo o a un péptido de este.
- En otra realización, la secuencia ADN del péptido PCT de la presente invención es al menos 70% homólogo a la secuencia ADN del PCT nativo o a un péptido de este. En otra realización, la secuencia ADN del péptido PCT de la presente invención es al menos 80% homólogo a la secuencia ADN del PCT nativo o a un péptido del mismo. En otra realización, la secuencia ADN del péptido PCT de la presente invención es al menos 90% homólogo a la secuencia ADN del PCT nativo o a un péptido de este. En otra realización, la secuencia ADN del péptido PCT de la presente invención es al menos 95% homólogo a la secuencia ADN del PCT nativo o a un péptido de este.
- En otra realización, al menos una de las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica está truncada.
- En otra realización, 2 de las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, 2 o más de las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, todas las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica están truncadas. El

PCT se compone de las primeras 10 AA del N.º ID SEC: 43, p. ej., la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS. En otra realización, el PCT truncado se compone de las primeras 11 AA del N.º ID SEC: 43. En otra realización, el PCT truncado se compone de las primeras 12 AA del N.º ID SEC: 43. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En otra realización, al menos una de las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica está glicosilada. En otra realización, 2 de las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En otra realización, 2 o más de las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En otra realización, todas las secuencias AA del PCT de la gonadotropina coriónica están glicosiladas. En otra realización, la secuencia PCT de la presente invención se compone de al menos un sitio de glicosilado. En otra realización, la secuencia PCT de la presente invención se compone de 2 sitios de glicosilado. En otra realización, la secuencia PCT de la presente invención se compone de 3 sitios de glicosilado. En otra realización, la secuencia PCT de la presente invención se compone de 4 sitios de glicosilado.

Se utilizó eritropoyetina (EPO) de acuerdo a las enseñanzas de la presente invención. En algunas realizaciones, cualquier EPO que codifica la secuencia AA es una secuencia EPO. En algunas realizaciones, cualquier EPO que codifica la secuencia de ácido nucleico es una secuencia EPO. En algunas realizaciones, la unión de secuencias PCT al extremo amino- y carboxi-terminal de la proteína EPO resulta en potencia aumentada al estimular eritropoyetina (Figuras 3-5) y (Tabla 6 del Ejemplo 4), en comparación al EPO recombinante y otras combinaciones de EPO y PCT. En algunas realizaciones, un EPO unido a tres secuencias PCT no deshabilita la unión a su receptor, como se muestra en la Tabla 4 del Ejemplo 3, la cual demuestra que el EPO unido a las tres secuencias PCT es igualmente eficaz para estimular la proliferación de las células TF-1 como el EPO de tipo silvestre. En algunas realizaciones los polipéptidos EPO-PCT de la presente invención se prevén en el N.º ID SEC: 3 y el N.º ID SEC: 6.

En otra realización, la "eritropoyetina" se refiere a la eritropoyetina de mamífero. En una realización, la "eritropoyetina" se refiere a una eritropoyetina humana, como la prevista en N.º de acceso a GenBank AAA52400. En una realización, la eritropoyetina o la secuencia EPO de la presente invención también se refiere a homólogos. En una realización, la secuencia AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos 50% homóloga a una secuencia de eritropoyetina prevista en N.º de acceso a GenBank AAA52400, como se determinó usando el software BlastP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros predeterminados. En una realización, la secuencia AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos 60% homóloga a una secuencia de eritropoyetina prevista en N.º de acceso a GenBank AAA52400, como se determinó usando el software BlastP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros predeterminados. En una realización, la secuencia AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos 70% homóloga a una secuencia de eritropoyetina prevista en N.º de acceso a GenBank AAA52400, como se determinó usando el software BlastP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros predeterminados. En una realización, la secuencia AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos 80% homóloga a una secuencia de eritropoyetina prevista en N.º de acceso a GenBank AAA52400, como se determinó usando el software BlastP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros predeterminados. En una realización, la secuencia AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos 90% homóloga a una secuencia de eritropoyetina prevista en N.º de acceso a GenBank AAA52400, como se determinó usando el software BlastP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros predeterminados. En una realización, la secuencia AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos 95% homóloga a una secuencia de eritropoyetina prevista en N.º de acceso a GenBank AAA52400, como se determinó usando el software BlastP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros predeterminados.

La presente invención proporciona polipéptidos que se componen de péptidos con carboxilo terminal (PCT) de gonadotropina coriónica unida a un péptido EPO y secuencia de ácido nucleico que la codifican, para usarse en el tratamiento o la inhibición de la anemia. Las siguientes realizaciones para el tratamiento o inhibición de la anemia forman parte de la invención en la medida en que los polipéptidos se componen de un péptido EPO, en donde un primer péptido con carboxilo terminal de gonadotropina coriónica está unido a un término amino de EPO, y un segundo y tercer péptido con carboxilo terminal de gonadotropina coriónica están unidos al extremo carboxilo terminal de EPO. En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene, adicionalmente, al menos un péptido AA PCT en el término N y al menos un péptido AA PCT en el término C para usarse en el tratamiento de la anemia. En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene, adicionalmente, un péptido AA PCT en el término N y dos péptidos AA PCT en el término C para usarse en el tratamiento

adicionalmente, al menos un péptido AA PCT en el término N y al menos un péptido AA PCT en el término C para aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. En otra realización, la presente divulgación describe una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene, adicionalmente, al menos un péptido AA PCT en el término N y al menos un péptido AA PCT en el término Q para aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. En otra realización, la presente divulgación describe una secuencia de ácido nucleico que codifica a un péptido EPO que tiene, adicionalmente, un péptido AA PCT en el término N y dos péptidos AA PCT en el término C para aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. En otra realización, la presente divulgación describe un ácido nucleico previsto en el N.º ID SEC: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido AA PCT en el término N y al menos un péptido AA PCT en el término C para aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. En otra realización, la presente divulgación describe un ácido nucleico previsto en el N.º ID SEC: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido AA PCT en el término N y dos péptidos AA PCT en el término C para aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones, el homólogo de acuerdo a la presente invención también abarca la eliminación, inserción o sustitución de variantes, incluyendo una sustitución AA, de este y de fragmentos de polipéptido biológicamente activos de este. En una realización la variante de sustitución se compone de una glicina en la posición 104 de la secuencia AA de eritropoyetina, la cual se sustituye por una serina (N.º ID SEC: 22). En una realización, el homólogo también se refiere a una eliminación, inserción o sustitución de variante, incluyendo una sustitución AA, de este y de fragmentos de polipéptido biológicamente activos de este. La secuencia de interés del polipéptido es un EPO. En una realización, la invención se emplea en medicina veterinaria. En una realización, la presente invención proporciona el tratamiento de mamíferos domesticados, de compañía para los humanos (p. ej.: perros, gatos, caballos), que tienen un valor comercial importante (p. ej.: vacas lecheras, ganado de engorda, animales para actividades deportivas), que tienen un valor científico importante (p. ej.: especímenes captivos o libres en peligro de extinción) o que tienen valor de alguna otra forma. En una realización, los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención se administraron a un animal (p. ej.: ratón, rata, conejo, hámster, conejillo de la India, cerdo, minicerdo, gallina, camello, cabra, caballo, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano y humano. En una realización, las aplicaciones recitadas tienen usos en una amplia variedad de huéspedes. En algunas realizaciones, dichos huéspedes incluyen, a título enunciativo y no limitativo, humanos, murinos, conejo, cabra, conejillo de la India, camellos, caballos, ratón, rata, hámster, cerdo, minicerdo, gallina, cabra, vaca, oveja, perro, gato o primate no humano. En una realización, los animales de granja reciben tratamiento con los métodos de la presente invención. En una realización, entre los animales de granja, se incluyen cerdos, ganado, vacas lecheras, caballos, cabras, ovejas, gallinas, pavos, gansos, patos y especies relacionadas. En una realización, los animales de laboratorio reciben tratamiento con los métodos de la presente invención. En una realización, entre los animales de laboratorio, se incluyen ratas, ratones, conejillo de la India, conejos, cabras, changos, perros, gatos y otros. En una realización, los animales del zoológico reciben tratamiento con los métodos de la presente invención. En una realización, los animales del zoológico incluyen todos los animales vertebrados en los zoológicos. En una realización, los animales acuáticos reciben tratamiento con los métodos de la presente invención. En una realización, entre los animales acuáticos, se incluyen peces, anguilas, tortugas, focas, pingüinos, tiburones, ballenas y especies relacionadas. En una realización, los animales domésticos reciben tratamiento con los métodos de la presente invención. En una realización, entre los animales domésticos, se incluye cualquier mascota, como gatos y perros, o animal que mantienen los humanos, como caballos, ganado, cerdos, cabras, conejos, gallinas, pavos, gansos, patos, etc.

De acuerdo a la presente invención el término cerdos incluye cerdos, lechón, puercos, cerdos jóvenes, cerdos castrados, jabalíes y cerdas. En otra realización, "ganado" se refiere a becerros, vacas, vacas lecheras, novillos y toros. En una realización, el EPO bovino se utiliza por los métodos de la presente invención. En una realización, el EPO bovino artificial se utiliza por los métodos de la presente invención. En una realización, el EPO bovino artificial tiene una secuencia prevista en la secuencia NCBI con número de ID NP_776334. En otra realización, el EPO bovino es cualquier otro EPO bovino conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En una realización, el EPO de cerdo se utiliza por los métodos de la presente invención. En una realización, el EPO de cerdo tiene una secuencia prevista en la secuencia NCBI con número de ID NP_999299. En otra realización, el EPO de cerdo es cualquier otro EPO de cerdo conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En una realización, el EPO de oveja se utiliza por los métodos de la presente invención. En una realización, el EPO de oveja tiene una

secuencia prevista en la secuencia NCBI con número de ID NP_001019908. En otra realización, el EPO de oveja es cualquier otro EPO de oveja conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En una realización, el EPO murino se utiliza por los métodos de la presente invención. En una realización, el EPO murino tiene una secuencia prevista en la secuencia NCBI con número de ID CAA72707. En otra realización, el EPO murino es cualquier otro EPO murino conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En algunas realizaciones, la modificación de la secuencia PCT es una ventaja ya que permite usar dosis inferiores. En algunas realizaciones, el "polipéptido", como se usa en la presente, abarca polipéptidos nativos (ya sea productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (generalmente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), al igual que péptidos y semipéptidos, los cuales son análogos a los polipéptidos y, en algunas realizaciones, tienen modificaciones que hacen que los polipéptidos sean aún más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar dentro de las células. En algunas realizaciones, las modificaciones incluyen, a título enunciativo y no limitativo, una modificación al término N, modificación al término C, modificación al enlace polipéptido, incluyendo, a título enunciativo y no limitativo, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones a estructuras fundamentales y modificación a residuo. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en el campo y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), los cuales se incorporan por referencia como se proveen totalmente en la presente. Más adelante, se proporcionarán detalles adicionales al respecto. En algunas realizaciones, los enlaces de polipéptido (-CO-NH-) dentro del polipéptido son sustituidos. En algunas realizaciones, los enlaces de polipéptido son sustituidos por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipéptido son sustituidos por enlaces éster (-C(R)H-CO-O-C(R)-N-). En algunas realizaciones, los enlaces polipéptidos son sustituidos por enlaces cetometileno (-CO-CH₂-). En algunas realizaciones, los enlaces polipéptido son sustituidos por enlaces α -aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es un alquilo, p. ej., metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces de polipéptido son sustituidos por enlaces de hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-). En algunas realizaciones, los enlaces polipéptidos son sustituidos por enlaces tiamida (-CS-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipéptidos son sustituidos por enlaces dobles olefínicos (-CH=CH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipéptidos son sustituidos por enlaces retro amida (-NH=CO-). En algunas realizaciones, los enlaces de polipéptido son sustituidos por derivados de polipéptido (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es el lado "normal" de la cadena, presente en forma natural en el átomo de carbono. En algunas realizaciones, estas modificaciones ocurren cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena de polipéptido e incluso en varios (2 a 3 enlaces) a la vez. En algunas realizaciones, los AA aromáticos naturales del polipéptido, como Trp, Tyr y Phe, se sustituyeron por ácidos sintéticos no naturales, como la fenilglicina, TIC, naftilamina (Nol), derivados de anillos metilados de Phe, derivados de halo generado de Phe u o-metilo-Tyr. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más AA modificado o uno o más monómeros no-AA (p. ej. ácido grasoso, carbohidratos complejos, etc.). En una realización, se entiende que "AA" o "AA incluye los 20 AA de origen natural, aquellos AA que, generalmente, se someten a modificación postraslacional *in vivo* e incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadipico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. En una realización, "AA" incluye D- y L-AA. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en tratamientos terapéuticos, los cuales requieren que los polipéptidos estén en forma soluble. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más AA polares naturales y no naturales, que incluyen, pero no se limitan a, serina y treonina, los cuales son capaces de aumentar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral con contenido hidroxilo. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en una forma lineal, aunque aquellos con experiencia en la técnica podrán apreciar que, en los casos en que la ciclación no interfiere demasiado con las características del polipéptido, también se pueden utilizar las formas cíclicas. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención son sintetizados bioquímicamente usando técnicas estándar de fase sólida. En algunas realizaciones, estos métodos bioquímicos incluyen exclusivamente síntesis en fase sólida, síntesis en fase parcialmente sólida, condensación de fragmentos o síntesis clásica de la solución. En algunas realizaciones, estos métodos se utilizan cuando el polipéptido es relativamente corto (aproximadamente 5-15kDa) y/o cuando no puede producirse por técnicas recombinantes (p. ej.: no codificadas por una secuencia de ácido nucleico) y por lo tanto involucra una química diferente. En algunas realizaciones, los procedimientos síntesis de polipéptidos en fase sólida son bien conocidos para aquellos con experiencia

en la técnica y fueron descritos adicionalmente por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984). En algunas realizaciones, los polipéptidos sintéticos se purifican mediante una cromatografía de líquidos de alto rendimiento Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y., y su composición puede confirmarse por secuenciación de AA por métodos conocidos por aquellos con experiencia en técnica. En algunas realizaciones, las técnicas de proteína recombinante se usan para generar los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, las técnicas de proteínas recombinantes se usan para generar polipéptidos relativamente largos (p. ej.: más largos que 18 a 25 AA). En algunas realizaciones, las técnicas de proteína recombinante se usan para generar grandes cantidades del polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, las técnicas recombinantes fueron descritas por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 and Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, págs. 421-463. En una realización, un polipéptido de la presente invención se sintetiza utilizando un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica al polipéptido de la presente invención está ligado a un vector de expresión, que se compone de un control de transcripción de una secuencia reguladora cis (p. ej. secuencia promotora). En algunas realizaciones, la secuencia reguladora cis es adecuada para orientar una expresión constitutiva del polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora cis es adecuada para orientar una expresión específica de tejido del polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora cis es adecuada para orientar una expresión inducible del polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, los polinucleótidos que expresan los polipéptidos de la presente invención son previstos en los N.º ID de SEC: 20; 21, 44, 45 y 46. En algunas realizaciones, los promotores específicos de tejido adecuados para usar con la presente invención incluyen secuencias que son funcionales en una población celular específica, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotores como la albumina, que es específica del hígado (Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277, promotores específicos linfáticos Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275, en particular, promotores de los receptores de las células T Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8:729-733 e inmunoglobinas; Banerji et al. (1983) *Cell* 33729-740, promotores específicos de neuronas, como el promotor de neurofilamento Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477, promotores específicos del páncreas Edlunch et al. (1985) *Science* 230: 912-916 o promotores específicos de la glándula mamaria. como el promotor del suero de leche (Pat. de los EE. UU. N.º 4,873,316 y Publicación de Solicitud Europea N.º 264,166). Los promotores inducibles adecuados para usar con la presente invención incluyen, por ejemplo, el promotor inducible de tetraciclina (Srouf, M.A., et al., 2003 *Thromb. Haemost.* 90: 398-405). En una realización, la frase "un polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos de hebras simples o dobles, las cuales pueden aislarse y proporcionarse en la forma de una secuencia ARN, una secuencia de polinucleótido complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómico y/o unas secuencias de polinucleótido compuesto (p. ej., una combinación de lo anterior). En una realización, la "secuencia de polinucleótido complementario" se refiere a una secuencia, la cual resulta de una transcripción inversa del mensajero RNA usando una transcriptasa inversa o cualquier otra RNA dependiente de ADN-polimerasa. En una realización, la secuencia puede ser amplificada subsecuentemente *in vivo* o *in vitro* usando ADN-polimerasa. En una realización, la "secuencia de polinucleótido genómico" se refiere a una secuencia derivada (aislada) a partir de un cromosoma y, por lo tanto, representa una porción contigua de un cromosoma. En una realización, la "secuencia de polinucleótido compuesta" se refiere a una secuencia, la cual es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una realización, una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exonales requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, al igual que algunas secuencias intrónicas interponiéndose entre ellas. En una realización, las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, incluidos otros genes, y generalmente, incluirán secuencias conservadas de señal empalmada. En una realización, las secuencias intrónicas incluyen elementos reguladores de la expresión cis. En una realización, los polinucleótidos de la presente invención se componen además de una secuencia de señal que codifica un péptido señal para la secreción de los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, las secuencias de señal, incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de señal endógena para EPO, como se prevé en N.º ID SEC: 19. En otra realización, la secuencia de señal es la terminal N de la secuencia PCT que es a la vez la terminal N de la secuencia de polipéptido de interés; p. ej. la secuencia es (a) secuencia de señal (b) PCT (c) secuencia de interés (d) dos secuencias PCT

adicionales. También se divulgó que se insertaron una o más secuencias PCT entre la señal de secuencia de una secuencia de polipéptido de interés y la propia secuencia de polipéptido de interés, lo que interrumpe, por lo tanto, la secuencia silvestre de interés. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En una realización, luego de la expresión y secreción, los péptidos señal se cortan de las proteínas precursoras, lo que produce proteínas maduras. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención se preparan usando técnicas PCT, como se describe en el Ejemplo 1, o en cualquier otro método o procedimiento conocido para aquellos con experiencia en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento involucra la unión de dos secuencias de ADN diferentes (consultar, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992). En una realización, los polinucleótidos de la presente invención se insertan en un vector de expresión (p. ej. una construcción de ácido nucleico) para habilitar la expresión del polipéptido recombinante. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales, las cuales hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariotas. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales, las cuales hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye un vector transportador que hace que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariotas y eucariotas. En algunas realizaciones, los vectores de clonación se componen de secuencias de iniciación de transcripción y traslación (p. ej., promotores, realzadores) y terminadores de transcripción y traslación (p. ej., señales de poliadenilación). En una realización, se pueden usar una serie de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión en huésped para expresar los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, como bacteria transformada con un ADN bacteriófago recombinante, ADN plásmido o vector de expresión ADN cósmido que contiene la secuencia de codificación de polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contiene la secuencia de codificación de polipéptido; sistemas celulares de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (p. ej., virus mosaico del coliflor, CaMV, virus mosaico del tabaco, TMV) o transformado con vectores de expresión de plásmido recombinante, como plásmido Ti, que contiene la secuencia de codificación de polipéptido. En algunas realizaciones, se usan los sistemas de expresiones no bacterianas (p. ej. sistemas de expresión de mamíferos como las células CHO) para expresar el polipéptido de la presente invención. En una realización, el vector de expresión utilizado para expresar los polinucleótidos de la presente invención en células mamíferas es el vector pCI-DHFR, que se compone de un promotor CMV y un gen de resistencia a neomicina. La construcción del vector pCI-dhfr se describe, de acuerdo a una realización, en el Ejemplo 1. En algunas realizaciones, en sistemas bacteriales de la presente invención, se puede seleccionar favorablemente un número de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el polipéptido expresado. En una realización, se desean grandes cantidades del polipéptido. En una realización, se desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto de proteína, posiblemente debido a la fusión con una secuencia de señal hidrófoba, la cual dirige el producto expresado dentro del periplasma de la bacteria o el medio del cultivo donde el producto de proteína se purifica fácilmente. En una realización, cierta proteína de fusión se diseña con un sitio de clivaje específico para ayudar en la recuperación del polipéptido. En una realización, los vectores que se adaptan a dicha manipulación incluyen, pero no se limitan a, las series pET de los vectores de expresión en *E. coli* Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990). En una realización, se utilizan los sistemas de expresión de levadura. En una realización, puede utilizarse una serie de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles en levadura, como lo divulga la Solicitud de Pat. de los EE.UU. 5.932.447. En otra realización, se utilizan los vectores que promueven la integración de secuencias de ADN foráneo dentro del cromosoma de levadura. En una realización, el vector de expresión de la presente invención puede incluir además secuencias adicionales de polinucleótidos que permiten, por ejemplo, la traslación de varias proteínas a partir de un ARNm como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y secuencias para la integración genómica del polipéptido quimérico promotor. En algunas realizaciones, los vectores de expresión mamífera incluyen, pero no se limitan a, pcADN3, pcADN 3.1 (+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pdisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, los cuales están disponibles de Invitrogen; pCI, el cual está disponible de Promega; pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV, los cuales están disponibles de Strategene; pTRES, el cual está disponible de Clontech, y sus derivados. En algunas realizaciones, la presente invención utiliza los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de los virus eucariotas, como los retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas realizaciones, los vectores derivados del virus del papiloma bovino

incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein Bar incluyen HEBO y p205. Otros ejemplos de vectores incluyen pMSG, pAV009/A", pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas según la dirección del promotor temprano SV-40, promotor tardío SV-40, promotor metalotioneina, promotor del virus del tumor mamario murino, 5 promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor polihedrina u otros promotores que han mostrado ser eficaces para la expresión en células eucariotas.

En algunas realizaciones, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de los polipéptidos de la presente invención debido a que ofrecen ventajas como la infección lateral y especificidad de objetivo. En una realización, la infección lateral es inherente al ciclo de vida de, por 10 ejemplo, un retrovirus y es el proceso por el cual una sola célula infectada produce una gran progenie de viriones que brotan e infectan a células aledañas. En una realización, el resultado es que un área grande se infecta rápidamente, en donde la mayoría no estaba infectada por las partículas virales originales. En una realización, se producen los vectores virales los cuales son incapaces de propagarse lateralmente. En una realización, esta característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen específico 15 dentro de un número localizado de las células diana.

En una realización, se pueden usar varios métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención dentro de células. Dichos métodos se describen generalmente en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), en Ausubel et al., 20 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) and Gilboa et al. Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986 e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Véanse además, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.464.764 y N.º 5.487.992 para los métodos de selección positivos y 25 negativos.

En algunas realizaciones, la introducción de ácido nucleico por infección viral ofrece varias ventajas sobre los otros métodos, como la lipofección y electroporación, porque se puede obtener una mayor eficacia debido a la naturaleza infecciosa de los virus. En una realización, se apreciará que los polipéptidos de la presente invención también pueden expresarse a partir de una construcción de ácido nucleico administrada a un individuo que emplea cualquier modo adecuado de administración descrito en 30 el presente (p. ej., terapia génica *in vivo*). En una realización, la construcción de ácido nucleico se introduce dentro de una célula adecuada por un medio/método adecuado de suministro del gen (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión como sea necesario, y luego las células modificadas se expanden en un cultivo y se regresan al individuo (p. ej., terapia génica *ex-vivo*).

En una realización, la terapia génica *in vivo* usando EPO se ha intentado en modelos animales, como en roedores Bohl et al., Blood. 2000; 95:2793-2798 y primates Gao et al., Blood, 35 2004, Volume 103, Number 9, y se ha comprobado su éxito en pruebas clínicas en seres humanos, en pacientes con insuficiencia renal crónica Lippin et al Blood 2005, 106, Number 7. En una realización, se utilizan los vectores de expresión en plantas. En una realización, la expresión de una secuencia de codificación depolipéptido se activa por una serie de promotores. En algunas realizaciones, se utilizan los 40 promotores virales, como los promotores 35S RNA y 19S RNA de CaMV Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984), o el promotor de la proteína de cubierta del TMV Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311 (1987). En otra realización se utilizan promotores de plantas como, por ejemplo, la pequeña subunidad de RUBISCO Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); y Brogli et al., Science 224:838-843 (1984) o promotores de choque térmico, p. ej., la soya hsp17.5-E o hsp17.3-B Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986). En una realización, los constructos se introducen dentro de las células de la planta usando 45 plásmido Ti, plásmido Ri, vectores virales en plantas, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación y otras técnicas conocidas para aquellos con experiencia la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach & Weissbach Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, págs. 421-463 (1988). Otros sistemas de expresión, como sistemas célula huésped de insectos y mamíferos, que son conocidos en la técnica, también pueden utilizarse en la presente invención. Se apreciará que, aparte de contar con los elementos necesarios para la transcripción y traslación de la secuencia de codificación introducida (codificación del polipéptido), la construcción de la expresión de la presente invención también puede incluir secuencias diseñadas para optimizar la estabilidad, producción, purificación, producción o actividad del polipéptido expresado. En algunas realizaciones, se pueden usar 50 varios métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención dentro del sistema de célula huésped. En algunas realizaciones, dichos métodos se describen generalmente en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989),

Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) and Gilboa et al. Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986 e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Véanse además las Pat. de los EE.UU. N.º 5.464.764 y N.º 5.487.992 para los métodos de selección positivos y negativos. En algunas realizaciones, las células transformadas son cultivadas en condiciones eficaces, lo cual permite que la expresión tenga grandes cantidades de polipéptido recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones eficaces del cultivo incluyen, pero no se limitan a, condiciones de medio eficaz, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de proteína. En una realización, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el cual se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. En algunas realizaciones, un medio incluye, generalmente, una solución acuosa que tiene fuentes similares de carbono, nitrógeno y fosfato, así como las sales, minerales, metales y otros nutrientes adecuados, como vitaminas. En algunas realizaciones, las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraz con agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo son conocidas por aquellos con experiencia normal en la técnica. En algunas realizaciones, dependiendo del vector y sistema huésped usado para la producción, los polipéptidos resultantes de la presente invención permanecen dentro de la célula recombinante, secretados dentro del medio de fermentación, secretados dentro de un espacio entre las dos membranas celulares, como en el espacio periplásmico en *E. coli*, o retenidos en la superficie externa de una célula o membrana viral. En una realización, después de un tiempo predeterminado de cultivo, se ve afectada la recuperación del polipéptido recombinante. En una realización, la frase "recuperación del polipéptido recombinante" se usa en el presente para hacer referencia a la recolección de todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no necesita implicar pasos adicionales de separación o purificación. En una realización, los polipéptidos de la presente invención se purifican usando una variedad de técnicas de purificación estándar, como, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio de iones, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatografía de enfoque y solubilización diferencial. En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia codificada expresada puede diseñarse para codificar el polipéptido de la presente invención y la fracción de clivaje fusionada. En una realización, una proteína de fusión puede diseñarse de manera que el polipéptido esté listo para aislarse por cromatografía de afinidad; p. ej., por inmovilización en una columna específica para la fracción de clivaje. En una realización, se diseña un sitio de clivaje entre el polipéptido y la fracción de clivaje, y el polipéptido puede liberarse desde la columna de cromatografía por tratamiento con la enzima o agente apropiado que cliva específicamente la proteína de fusión en este sitio p. ej., véanse Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); y Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990). En una realización, el polipéptido de la presente invención se extrae en una forma "substancialmente pura". En una realización, la frase "substancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en el presente. En una realización, el polipéptido de la presente invención también puede sintetizarse usando sistemas de expresión *in vitro*. En una realización, los métodos de síntesis *in vitro* son conocidos en la técnica, y los componentes del sistema están disponibles comercialmente. En una realización, se ilustra la producción de polipéptidos PCT-EPO-PCT usando la tecnología de ADN recombinante en el ejemplo 1. En algunas realizaciones, los polipéptidos recombinantes son sintetizados y purificados; su eficacia terapéutica puede evaluarse *in vivo* o *in vitro*. En una realización, las actividades de enlace de los polipéptidos EPO recombinantes de la presente invención pueden determinarse usando varias evaluaciones como se describe en los Ejemplos 2-6 y 8-9. En una realización, la actividad de enlace *in vitro* se determina midiendo la habilidad del polipéptido para estimular la proliferación de las células TF-1. En una realización, la actividad *in vivo* se deduce al analizar los niveles de hematocritos (Figuras 3-5) y/o como un porcentaje de reticulocitos. En una realización, los polipéptidos EPO de la presente invención pueden usarse para tratar a un sujeto, con una variedad de padecimientos asociados con la eritropoyetina. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, la frase "padecimientos asociados con la eritropoyetina" se refiere a cualquier padecimiento asociado con una modulación debajo de lo normal, anormal o inapropiada de eritropoyetina. En algunas realizaciones, los niveles de eritropoyetina asociada con dichos padecimientos se determinan por cualquier medición aceptada y utilizada por aquellos con experiencia en la técnica. En algunas realizaciones, los padecimientos asociados con la eritropoyetina, generalmente, incluyen estados anémicos. En algunas realizaciones, los "estados

anémicos" se refieren a cualquier padecimiento, enfermedad o trastorno asociado con la anemia. En algunas realizaciones, los estados anémicos incluyen, pero no se limitan a, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, trasplante de médula ósea, síndrome de Churg-Strauss, anemia de Diamond Blackfan, anemia de Fanconi, síndrome Felty, enfermedad de injerto contra huésped, trasplante de células madre hematopoyéticas, síndrome urémico hemolítico, síndrome mielodisplásico, hemoglobinuria paroxística nocturna, osteomielofibrosis, pancitopenia, aplasia pura de glóbulos rojos, púrpura de Schoenlein-Henoch, anemia sideroblástica, anemia refractaria con exceso de blastocitos, artritis reumatoidea, síndrome de Shwachman, anemia de células falciformes, talasemia mayor, talasemia menor, púrpura trombocitopénica, etc.

Los métodos de tecnología recombinante de ADN pueden usarse para la producción de polipéptidos PCT-hGH-PCT, como se ilustra en el Ejemplo comparativo 7. En una realización, los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo *per se*. En una realización, los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica en donde se mezclan con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente con otros componentes químicos, como los portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo. En una realización, el "ingrediente activo" se refiere a una secuencia de interés del polipéptido, la cual es responsable del efecto biológico. En algunas realizaciones, cualquiera de las composiciones de esta divulgación involucrarán al menos dos secuencias PCT unidas a la proteína EPO de interés, como se describió anteriormente. En otra realización, la presente invención proporciona preparaciones combinadas. En una realización, una "preparación combinada" define especialmente un "estuche de partes" en el sentido de que los compañeros de combinación, como se definió anteriormente, pueden dosificarse independientemente o usando diferentes combinaciones fijas con cantidades distintivas de compañeros de combinación p. ej., simultáneamente, concurrentemente, separadamente o secuencialmente. En algunas realizaciones, las partes del estuche de partes pueden, p. ej., administrarse en forma simultánea o cronológicamente escalonadas, es decir a diferentes tiempos e intervalos iguales o diferentes para cualquier parte del estuche de partes. La proporción de las cantidades totales de la combinación, en algunas realizaciones, puede administrarse en la preparación combinada. En una realización, la preparación combinada puede variar, p. ej., con el fin de enfrentar las necesidades de una subpoblación de pacientes para tratar o las necesidades de un solo paciente con diferentes necesidades que pueden deberse a una enfermedad en particular, la gravedad de una enfermedad, la edad, el género o el peso corporal, cómo lo puede hacer una persona con experiencia en la técnica. En una realización, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable", que se usan intercambiabilmente, se refieren a un portador o a un diluyente que no ocasiona una irritación importante a un organismo y que no invalida la actividad ni las propiedades biológicas del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases. En una realización, uno de los ingredientes incluidos en el portador farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, un glicol de polietileno (PEG), un polímero biológicamente compatible con un amplio rango de solubilidad en medios orgánicos y acuosos (Mutter et al. (1979). En una realización, el "excipiente" se refiere a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica para facilitar, adicionalmente, la administración de un ingrediente activo. En una realización, los excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varias azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y glicoles de polietileno.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se encuentran en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA. En una realización, las rutas adecuadas de administración incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, transnasal, intestinal o parental, incluidas las inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares al igual que las inyecciones intratecales, interventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. En una realización, la preparación se administró de manera local en lugar que de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo del paciente. Esta invención contempla varias realizaciones con rangos de dosis. La dosis de polipéptido de la presente invención, en una de las realizaciones, está en el rango de 0,05-80 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 0,05-50 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 0,1-20 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 0,1-10 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 0,1-5 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 0,5-5 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 0,5-50 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 5-80 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 35-65 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 35-65 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 20-

60 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 45-60 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 60-120 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 120-240 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 40-60 mg/día. En otra realización la dosis está en el rango de 240-400 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 45-60 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 15-25 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosis está en el rango de 55-65 mg/día. En una realización, la dosis es 20 mg/día. En una realización, la dosis es 30 mg/día. En una realización, la dosis es 40 mg/día. En una realización, la dosis es 50 mg/día. En otra realización, la dosis es 60 mg/día. En una realización, la dosis es 70 mg/día. En una realización, la dosis es 80 mg/día. En una realización, la dosis es 90 mg/día. En una realización, la dosis es 100 mg/día. En una realización, la administración oral se compone de una dosis unitaria que consiste de tabletas, capsulas, pastillas, tabletas masticables, emulsiones y similares. Dichas dosis unitarias se componen de una cantidad segura y eficaz del compuesto, o compuestos deseados, de los cuales, en una realización, se incluyeron de aproximadamente 0,7 o 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg o, en otra realización, de aproximadamente 0,5 o 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para preparar las dosis unitarias para la administración oral son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las tabletas, generalmente, consisten de adyuvantes farmacéuticamente compatibles como diluyentes inertes, como carbonato de calcio, carbonato de sodio, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes, como almidón, gelatina y sacarosa; desintegrantes, como almidón, ácido alginico y croscarmelosa; lubricantes, como estearato de magnesio, ácido estérico y talco. En una realización, pueden usarse gliantes como el dióxido de silicona para mejorar las características de flujo de la mezcla en polvo. En una realización, los agentes colorantes, como los tintes FD&C, pueden agregarse para la apariencia. Los agentes endulzantes y saborizantes, como aspártamo, sacarina, mentol, mental y sabores de frutas, son adyuvantes útiles para las tabletas masticables. Las cápsulas, generalmente, se componen de uno o más diluyentes divulgados arriba. En algunas realizaciones, la selección de componentes del portador depende de consideraciones secundarias, como el gusto, el costo y la estabilidad de la vida útil, que no son esenciales para los propósitos de esta invención, y la puede hacer una persona con experiencia en la técnica.

En una realización, la forma de dosis oral se compone de un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosis oral de la presente invención se compone de tabletas de liberación prolongada, cápsulas, pastillas o tabletas masticables. En una realización, la forma de dosis oral de la presente invención se compone de tabletas de liberación lenta, cápsulas, pastillas o tabletas masticables. En una realización, la forma de dosis oral de la presente invención se compone de tabletas de liberación inmediata, cápsulas, pastillas o tabletas masticables. En una realización, la forma de dosis oral se formula de acuerdo al perfil de liberación deseado del ingrediente farmacéutico activo, como es conocido por aquellos con experiencia en la técnica.

Las composiciones preorales, en algunas realizaciones, se componen de soluciones líquidas, emulsiones, suspensiones y similares. En algunas realizaciones, los portadores farmacéuticamente aceptables son adecuados para la preparación de dichas composiciones y conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, las composiciones orales líquidas se componen de aproximadamente 0,012% a aproximadamente 0,933% del compuesto o compuestos deseados, o en otra realización, desde aproximadamente 0,033% a aproximadamente 0,7%. En algunas realizaciones, las composiciones para usar en la invención comprende soluciones o emulsiones, las cuales, en algunas realizaciones, son soluciones o emulsiones acuosas que se componen de una cantidad segura y eficaz de los compuestos de la presente invención y, opcionalmente, de otros compuestos, con el propósito de administración tópica intranasal. En algunas realizaciones, las composiciones se componen de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 10,0% p/v de un compuesto sujeto, con mayor preferencia, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2,0, los cuales se usan para la entrega sistémica de los compuestos por ruta intranasal. En otra realización, las composiciones farmacéuticas van a ser administradas por la inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran intravenosamente y, por lo tanto, son formuladas en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran intraarterialmente y, por lo tanto, son formuladas en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran intramucosamente y, por lo tanto, son formulados en una forma adecuada para la administración intramuscular. Además, en otra realización, las composiciones farmacéuticas se

administran tópicamente a las superficies corporales y, por lo tanto, son formuladas en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, los compuestos de la presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos adicionales apropiados, preparados y aplicados como

5 soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable, con o sin un portador farmacéutico. En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son fabricadas por procesos conocidos en la técnica, p. ej., por medio de mezclado convencional, procesos de disolución, granulado, levitación, emulsificación, encapsulado, atrapamiento o liofilización.

10 En una realización, las composiciones farmacéuticas para usarse de acuerdo con la presente invención se formulan de una forma convencional usando uno o más portadores fisiológicos aceptables que se componen de excipientes y auxiliares, los cuales facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. En una realización, la formulación depende de la ruta de administración escogida. En una realización, los inyectables de la invención son formulados en

15 soluciones acuosas. En una realización, los inyectables de la invención son formulados en amortiguadores compatibles fisiológicamente, como solución de Hank, solución de Ringer o amortiguador de sal fisiológica. En algunas realizaciones, para la administración transmucosal, en la formulación se usan penetrantes adecuados para la barrera por permear. Dichos penetrantes son, generalmente, conocidos por personas con experiencia en la técnica. En una realización, las preparaciones descritas en la presente son formuladas para la administración parenteral, p. ej. por

20 inyección en bolo o infusión continua. En algunas realizaciones, las formulaciones para la inyección se presentan en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en envases de dosis múltiples y, opcionalmente, con conservantes adicionales. En algunas realizaciones, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en medios aceitosos o acuosos y contienen agentes de formulación, tales comoagentes de suspensión, estabilización y/o dispersantes. En algunas

25 realizaciones, las composiciones también se componen de conservantes, como el cloruro de benzalconio, timerosal y similares, agentes quelatantes, como el edetato de sodio y otros; amortiguadores como el fosfato, citrato y acetato; agentes tónicos, como el cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes, como el ácido ascórbico, acetil cistina, metabisulfato de sodio y otros; agentes aromáticos; ajustadores de viscosidad, como los polímeros, incluyendo celulosa y derivados de esta, y alcohol polivinílico, así como ácidos y bases para ajustar el pH de estas

30 composiciones acuosas como sea necesario. En algunas realizaciones, las composiciones también consisten de anestésicos locales u otros activos. Las composiciones pueden usarse como espray, rocío, gotas y similares. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua.

35 Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos, en algunas realizaciones, se preparan de acuerdo a suspensiones de inyección aceitosa o a base de agua. Los solventes o medios lipofílicos adecuados incluyen, en algunas realizaciones, aceites grasos, como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintético, como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa contienen, en algunas realizaciones, sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrina. En otra realización, la suspensión también

40 contiene estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir lapreparación de soluciones altamente concentradas. En otra realización, el compuesto activo puede entregarse en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 317-327; véase en general *ibid.*). En otra realización, la composición farmacéutica por suministrar en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótico implantable, parche

45 transdérmico, liposomas u otras formas de administración. En una realización, se usa una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos. En aún otra realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada próximo a un

50 objetivo terapéutico, p. ej., el cerebro, lo que requiere, por lo tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Se tartan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)). En algunas realizaciones, el ingrediente activo está en forma de polvo para la

55 constitución antes del uso con un vehículo adecuado, p. ej., solución estéril, a base de agua libre de pirógeno. Las composiciones se formulan, en algunas realizaciones, para administrarlas por atomización e inhalación. En otra realización, las composiciones se encuentran en un envase con medios

atomizadores adjuntos.

En una realización, la presentación de la presente invención se formula en composiciones rectales, como supositorios o enemas de retención, usando, p. ej., bases convencionales de supositorios, como manteca de cacao u otros glicéridos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones donde el ingrediente activo se compone de la cantidad eficaz para lograr el propósito propuesto. En algunas realizaciones, una cantidad terapéutica eficaz significa una cantidad de ingredientes activos eficaces para evitar, aliviar o aminorar los síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto bajo tratamiento. En una realización, la determinación de una cantidad eficaz terapéutica está bien dentro de la capacidad de aquellos con experiencia en la técnica.

Las composiciones también se componen de conservadores, como el cloruro de benzalconio y timerosal y similares, agentes quelatantes, como el edetato de sodio y otros; amortiguadores, como fosfato, citrato y acetato; agentes tónicos, como el cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes, como el ácido ascórbico, acetil cistina, metabisulfato de sodio y otros; agentes aromáticos; ajustadores de viscosidad, como los polímeros, incluyendo celulosa y derivados de esta; y alcohol polivinílico, así como ácidos y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas como sea necesario. Las composiciones también consisten de anestésicos locales u otros activos. Las composiciones pueden usarse como spray, rocío, gotas y similares.

Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables o componentes de estos son azúcares, como la lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados, como carboximetilcelulosa de sodio, celulosa de etilo y celulosa de metilo; tragacanto en polvo; malta, gelatina, talco; lubricantes sólidos, como el ácido estérico y estearato de magnesio; sulfato de calcio, aceites vegetales, como el aceite de cacahuate, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma, poli aceites como el glicol propileno, glicerina, sorbitol, manitol y glicol polietileno; ácido alginico; emulsificadores, como los emulsificadores de la marca Tween™; agentes humectantes, como sulfato laurillo de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes; agentes para la formación de tabletas, antioxidantes, conservantes, agua libre de pirógeno; salina isotónica y soluciones amortiguadoras de fosfato. La opción de un portador farmacéuticamente aceptable para usarse conjuntamente con el compuesto se determina, básicamente, por la forma en que el compuesto será administrado. Si el compuesto va a ser inyectado, en una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es estéril, fisiológicamente salino, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH debe ajustarse a aproximadamente 7,4.

Además, las composiciones se componen de aglutinantes (p. ej. acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, celulosa de etilo, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, povidona); agentes desintegrantes (p. ej., almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, dióxido de silicón, croscaramelosa de sodio, crospovidona, goma guar, almidón de sodio glicolato); amortiguadores (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato) de varios pH y fortaleza iónica; aditivos, como albumina o gelatina, para evitar la absorción a superficies; detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de potasa, surfactantes (p. ej., sulfato laurillo de sodio), potenciadores de impermeabilización, agentes solubilizantes (p. ej., glicerol, polietileno glicerol), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfato de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizadores (p. ej. hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes para aumentar la viscosidad (p. ej. carbómero, dióxido de silicón coloidal, etilcelulosa, goma guar), endulzantes (p. ej. aspártamo, ácido cítrico), conservantes (p. ej., Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (p. ej. ácido esteárico, estearato de magnesio, glicol de polietileno, sulfato laurillo de sodio), ayudas para flujo (p. ej. dióxido de silicón dietílico), plastificantes (p. ej., ftalato dietílico, citrato trietilico), emulsificadores (p. ej. carbómeros, hidroxipropil celulosa, sulfato laurillo de sodio), recubrimientos de polímeros (p. ej., polaxámeros o poloxaminas), agentes de formación de recubrimiento y película (p. ej. celulosa de etilo, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

Componentes típicos de portadores para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen celulosa de metilo, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa (p. ej. Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato de sodio; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y polietilénóxido de sorbitan (p. ej. polisorbato 80). Los conservadores típicos incluyen metilparabeno y benzoato de sodio. En otra realización, las composiciones de líquido oral también contienen uno o más componentes, como endulzantes, agentes saborizantes y colorantes divulgados arriba.

Las composiciones también incluyeron la incorporación de material activo dentro o sobre las preparaciones particuladas de compuestos poliméricos como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares,

fantasmas de eritrocitos o esferoplastos). Dichas composiciones influenciarán el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de la liberación *in vivo* y velocidad de desplazamiento *in vivo*.

También se encuentran incluidas en la invención las composiciones recubiertas con polímeros (p. ej. poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra receptores

5 específicos de tejido, ligandos o antígenos, o acoplados a ligandos de receptores específicos del tejido. En algunas realizaciones, los compuestos modificados por la unión covalente de los polímeros solubles en agua como el glicol de polietileno, copolímeros de glicol de polietileno y glicol de polipropileno, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. En otra realización, los compuestos modificados exhiben semividas substancialmente más largas en la sangre después de
10 una inyección intravenosa que los correspondientes a compuestos sin modificar. En una realización, las modificaciones también aumentan la solubilidad del compuesto en la solución acuosa, eliminando la agregación, mejorando la estabilidad física y química del compuesto, y reduce enormemente la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra realización, la actividad biológica *in vivo* deseada se logra por la administración de fracciones de dicho compuesto polimérico con menor frecuencia o en
15 menores dosis que con el compuesto sin modificar. En algunas realizaciones, la preparación de una cantidad o dosis eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. En una realización, se puede formular una dosis en modelos animales, y dicha información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis en humanos. En una realización, la eficacia de toxicidad y terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente puede determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos de células o animales experimentales. En una realización, los
20 datos obtenidos de estas pruebas de cultivo de células *in vitro* y estudios de animales pueden usarse en la formulación de un rango de dosis para el uso en humanos. En una realización, las dosis varían en función de la forma de la dosis y la ruta de administración utilizadas. En una realización, la formulación exacta, ruta de administración y dosis pueden ser escogidas por el médico del individuo al ver la condición del paciente. Véase, p. ej., Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1. En una realización, dependiendo de la gravedad y respuesta de la enfermedad por tratar, las dosis pueden ser de una o varias administraciones, con un tratamiento de al menos varios días a varias semanas o hasta que se logre la cura o la disminución de la enfermedad. En una realización, la cantidad de composición por administrar dependerá del sujeto que se tratará, la gravedad de la afección, la forma de administración, la opinión del médico interviniente, etc. En una realización, también se preparan composiciones que incluyen la preparación de la presente invención, formuladas en un portador farmacéuticamente aceptable, colocadas en el recipiente y etiquetadas para tratar la enfermedad
30 indicada. En una realización, las composiciones de la presente invención se presentan en un paquete o dispositivo dispensador, como en un estuche aprobado por la FDA, que contiene una o más dosis unitarias que contienen el ingrediente activo. En una realización, el paquete, por ejemplo, consiste de papel metálico o plástico, como un paquete sellado. En una realización, el paquete o dispositivo dispensador contiene instrucciones para su administración. En una realización, el paquete o dispensador contiene un aviso asociado con el recipiente en una forma establecida por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso o venta de fármacos; dicho aviso refleja la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, en una realización, está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. como etiquetado o como prospecto de un producto aprobado. En una realización, se apreciará que los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para lograr un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada agente por sí solo. En otra
35 realización, las medidas (p. ej., dosis y selección del agente complementario) se toman en cuenta para los efectos secundarios adversos asociados con terapias combinadas.

Los objetos adicionales, ventajas y características noveles de la presente invención se harán evidentes para aquellos con experiencia en la técnica al analizar los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención,
40 como se describen en el presente y se reivindican en la sección de reivindicación a continuación, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

55 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes. Dichas técnicas se explican a detalles en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular

Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías previstas en las Patentes de los EE.UU. N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology", volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8.ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura de patentes y científica, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 183.791.932, 3.839.153; 3.850.752, 3.850.578; 3.853.987, 3.867.517, 3.879.262, 3.901.654, 3.935.074, 3.984.533, 3.996.345, 4.034.074, 4.098.876, 4.879.219, 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento.

A continuación, los ejemplos 1 a 6 se consideraran como parte de la invención en la medida que se refieran a los polipéptidos que se componen de un péptido EPO, donde una primer gonadotropina coriónica PCT esta unida al termino amino de EPO, y el segundo y tercer gonadotropina corionica PCT está unido al termino carboxilo de EPO y a las secuencias de ácido nucleico que lo codifican. Ejemplos 7 y 8 son comparativos.

EJEMPLO 1

Generación de construcciones EPO

MATERIALES Y MÉTODOS:

Construcción de un vector de expresión pCI-dhfr: el vector de expresión mamífero pCI-neo se compró de Promega (N.º de catálogo E1841). El vector contiene un realzador/promotor CMV IE y gen de neomicina fosfotrasferasa. El clon pSV2-dhfr se compró de ATCC (N.º de catálogo 37146). El plásmido contiene un gen dhfr murino. La construcción del vector pCI-dhfr se realizó de la siguiente manera:

a. El plásmido pSV2-dhfr se digirió con la enzima de restricción BgIII (extremo 3' del gen dhfr). Se usó ADN-polimerasa I, fragmento largo (Klenow) para llenar los colgantes de 5' para formar extremos romos. Luego el ADN se digirió con la enzima de restricción AvrII (extremo 5' del gen dhfr). Se aisló fragmento del gen dhfr (AvrII - extremo romo).

b. El vector pCI-neo se digirió con la enzima de restricción BstXI (extremo 3' del gen neo). Se usó ADN-polimerasa I, fragmento largo (Klenow) para eliminar los colgantes de 3' para formar extremos romos. Luego el ADN se digirió con la enzima de restricción AvrII (extremo 5' del gen neo). Se aisló el vector de expresión (AvrII - extremo romo).

c. El gen dhfr se ligó al vector pCI para formar un vector de expresión que contiene el gen dhfr (pCI-dhfr).

Construcción de variantes hEPO-PCT: Un gen casete que contiene el péptido con terminal T (PCT) de la subunidad beta de hCG se fusionó a la secuencia codificadora del EPO humano (NP_000790.2) en diferentes ubicaciones. Se construyeron cuatro variantes EPO-PCT, como se ilustra en las Figuras 1A-D. Se usó el péptido de señal proEPO para la construcción de las variantes EPO-PCT secretadas. Se ligaron fragmentos XbaI - NotI que contienen secuencias Epo a la expresión de vector pCI-dhfr de la

presente invención.

La Tabla 2 a continuación resume las primeras secuencias usadas para construir el PCT que contiene el polipéptido de la presente invención.

5

Tabla 2

10

15

20

25

| Número básico | N.º ID SEC | secuencia | Sitio de restricción (subrayado en la secuencia) |
|-----------------|------------|---|--|
| 1 | 7 | 5' AAT <u>CTAGAGG</u> TCATCATGGGGTGC 3' | XbaI |
| 2 | 8 | 5'ATT <u>GCGGCCG</u> CGGATCCAGAAGACCTTTATTG 3' | NotI |
| 17 ^R | 9 | 5' TAAATATTGGGGTGTCCGAGGGCCC 3' | SspI |
| 10 | 10 | 5' <u>CCAATATT</u> ACCACAAGCCCCACCACGCCTCAT3' | SspI |
| 11 ^R | 11 | 5' <u>TGCGGCCG</u> CGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC 3' | NotI |
| 15 | 12 | 5' GCCCTGCTGTCCGAAGC 3' | |
| 2 ^R | 13 | 5' ATT <u>GCGGCCG</u> CGGATCCAGAAGACCTTTATTG | NotI |
| 23 ^R | 14 | 5'CTTTGAGGAAGAGGAGCCCAGGACTGGGAGGC3' | |
| 24 | 15 | 5' CCTGGGCTCCTCTTCCTCAAAGGC 3' | |
| 38 ^R | 16 | 5' GCTCCGACAGCAGGGC 3' | |

EPO-1 701-1-p17-6 (Epo-1 - N.º ID SEC: 1): Se construyó el fragmento XbaI-NotI 702 bp por PCT usando los cebadores anteriores (N.º de ID SEC: 7-16). Luego se ligó el fragmento XbaI-NotI PCR que contiene la secuencia Epo-ctp al vector de expresión pCl-dhfr.

30

EPO-2 701-2-p24-2 (Epo-2 N.º ID SEC: 2): Se reemplazó el fragmento XbaI/ApaI (hGH-ctp) de pCl-dhfr-401-2-p21-2 (hGH- ctpx2) por el fragmento XbaI/ApaI (EPO-ctp) de 701-1-p17-6 para crear un Epo-ctpx2.

35

EPO-4-701-4-p42-1(Epo-4 - N.º ID SEC: 4): Primeramente, se construyó el fragmento desde pCl-dhfr-EPO-ctp (701-1-p17-6) por PCR usando los cebadores 1 y 17 seguidos por digestión de XbaI/SspI. Esto dio como resultado un fragmento que contiene EPO y un PCT parcial de 5'.

Segundo, se construyó un nuevo fragmento al traslapar pCT, sobre pGT123-hEpo como una plantilla, usando el cebador 10 y el cebador 11. La digestión SspI/NotI dio como resultado el fragmento que contiene PCT parcial de 3' y Epo.

Los dos fragmentos fueron ligados en pCl-dhfr para construir el clon p701-4-p42-1.

40

EPO-3-p56-6 (Epo-3 N.º ID SEC; 3): Los cebadores se compraron de Sigma-Genosys. La reacción PCR se realizó usando el cebador 15 (N.º ID SEC: 12) y el cebador 2^R (N.º ID SEC: 13), y plásmido ADN de pCl-dhfr- EPO-ctp x2 (701-2-p24-2) como plantilla. Como resultado de la ampliación, se formó un producto 486 bp y se ligó al vector de clonación TA(Invitrogen, catalogo K2000-01). Se aisló el fragmento Stu I -NotI que contenía la secuencia *Epo-ctp x2 (209 bp).

45

Se realizaron tres reacciones PCR secuenciales. La primera reacción se llevó a cabo con el cebador 1 (N.º ID SEC: 7) y el cebador 23^R (N.º ID SEC: 14), y plásmido ADN de pGT123-epo-ctp como plantilla, como resultado de la ampliación por PCR, se formó un producto 80 bp (péptido de señal). La segunda reacción se llevó a cabo con el cebador 24 (N.º ID SEC: 15) y el cebador 11^R (N.º ID SEC: 11), y plásmido ADN de 701-4-p42-1 como plantilla; como resultado de la ampliación por PCR, se formó un producto 610 bp.

50

La última reacción se llevó a cabo con los cebadores 1 (N.º ID SEC: 7) y 11^R (N.º ID SEC: 11) y una mezcla de los productos de las dos anteriores reacciones como una plantilla; como resultado de la ampliación por PCR, se formó un producto 700 bp, y se aisló el fragmento XbaI-StuI,.

55

Los dos fragmentos (XbaI-StuI y StuI - NotI) se insertaron dentro del vector de expresión eucariota pCl-dhfr (ligación triple) para producir el clon 701-3-p56-6.

EPO-5-p91-4 (Epo-5 N.º ID SEC; 5 - (ctp- Epo): Los cebadores se ordenaron de Sigma-Genosys. Se realizó una reacción PCR usando el cebador 1 (N.º ID SEC: 7) y el cebador 11^R (N.º ID SEC: 11), y plásmido ADN de pCI-dhfr- ctp-EPO- ctp x2 (701-3-p56-6) como una plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto 670 bp, y se ligó al vector de clonación TA (Invitrogen, catalogo K2000-01) . El fragmento XbaI -NotI que contenía la secuencia ctp-Epo se ligó al vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 701-5-p91-4.

EPO-6-p90-1 (Epo-6 N.º ID SEC: 6 - (ctp- Epo-ctp): Se realizaron tres reacciones PCR. La primera reacción se llevó a cabo con el cebador 1 (N.º ID SEC: 7) y el cebador 38^R (N.º ID SEC: 16) y plásmido ADN de 701-3-p56-6 como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto 400 bp.

La segunda reacción se llevó a cabo con el cebador 15 (N.º ID SEC: 12) y el cebador 2^R (N.º ID SEC: 13), y el plásmido ADN de 701-1-p17-6 como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto 390 bp.

La última reacción se llevó a cabo con el cebador 1 (N.º ID SEC: 7) y el 2^R (N.º ID SEC: 13) y una mezcla de los productos de las dos anteriores reacciones como una plantilla, como resultado de la amplificación por PCR, se formó y ligó un producto 787 bp en el vector de clonación TA (Invitrogen, catalogo K2000-01). El fragmento XbaI -NotI que contiene la secuencia ctp-Epo-ctp se ligó al vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 701-6-p90-1.

EJEMPLO 2

Expresiones y aislamiento de los polipéptidos EPO-PCT

MATERIALES Y MÉTODOS

Transfección de ADN y selección de clon: Se transfectaron células DG44 con los vectores de expresión pCI-DHFR que contenían variantes EPO-PCT usando el reactivo FuGENE6 (FuGENE agente de transfección - Roche Cat. 11 815 091 001). 48 horas después de la transfección, las células se diluyeron y cultivaron a 50-200 células por pocillo en un medio selectivo (CD DG44sin HT (Gibco: Scotland parte: #07990111A) Sku num.:ME060027 suplementado con 8 mM L-Glutamina Biological Industries: Cat: 03-020-1A) y 18 mL/L de solución al 10 % de Pluronic F-68 (Gibco: Cat: 240040-032). Se analizaron los clones seleccionados para ver la producción de proteína más alta usando ELISA comercial. Los clones que producían de 3 a 5 por cada variante se congelaron para un banco de células de respaldo. Se adaptó un clon seleccionado para cada variante para crecer en cultivos de mayor escala en matraces de 1 L sobre un agitador orbital. Se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron por ELISA, SDS-PAGE y Westernblot. Después de retirar las alícuotas, los sobrenadantes que contienen la proteína se mantuvieron congelados para uso posterior.

Cultivo de células: Las células DG44 se mantuvieron en un medio DG44 con HT (cat# 12610-010, Gibco) suplementado con 8 mM L-Glutamina (Biological Industries: Cat: 03-020-1A) y 18 mL de solución al 10 % Pluronic F-68 (Gibco: Cat: 240040-032), a 37 °C en incubadora humidificada al 8 % de CO₂. Los clones transfectados se mantuvieron en medio basal DG44sin suplemento HT, hipoxantina y timidina, sin ácido plurónico y L-glutamina.

Preparación de muestra: Se recolectaron, filtraron y analizaron los sobrenadantes por ELISA para determinar la concentración de proteína. Se usó SDS-PAGE y Western Blot para determinar la pureza e identidad. Después de ELISA, se definieron las concentraciones de la muestra, y la solución se dializó contra PBS. Después de retirar las alícuotas, los sobrenadantes que contenían la proteína se mantuvieron congelados a 20 °C para uso posterior.

Western Blotting: Las muestras se sometieron a electroforesis con 15% de gel SDS poliacrilamida. Se permitió que los geles se equilibraran durante 10 min en 25 mM Tris y 192 mM glicina en 20 % (vol/vol) de metanol). Las proteínas se transfirieron a 0.2 mm de tamaño de poro de membrana de nitrocelulosa (Sigma, Saint Louis, MO) a 250 mA durante 3h, usando una celda de electroforesis Mini Trans-BlotI (Biorad Laboratories, Richmond, CA). La membrana de nitrocelulosa se incubó en leche seca sin grasa al 5% por 2 h a temperatura ambiente. Esta membrana se incubó con antisuero EPO (titulación 1:1000) durante la noche a 4 °C, seguido de tres lavados consecutivos en PBS con un contenido de 0.1 % Tween (10 min/lavado). La membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (HRP) (Zymed, San Francisco, CA) durante 2 h a temperatura ambiente, seguido de tres lavados. Finalmente, el papel de nitrocelulosa reaccionó para mejorar la luminescencia

química del sustrato (ECL) (Pierce, Rockford, IL) por 5 min, se secó con la Whatman y se expuso a una película de rayos X.

RESULTADOS

5

La tabla 3 a continuación muestra las concentraciones de varias formas de EPO de PCT modificado obtenido a partir de 5 clones seleccionados y su preparación para pruebas futuras.

10

Tabla 3

| N.º versión | N.º clon | Stock Titulación IU/ml ¹ | Post dilución en Mock sup. de acuerdo a la titulación Epo3 | Post ultrafiltración IU/ml ³ |
|------------------------|----------|-------------------------------------|--|---|
| Epo0 N.º ID SEC: 16 | 17 | 3093 | 102 | 335 |
| Epo1 N.º ID SEC: 1 | 47 | 1049 | 104 | 291 |
| Epo2 N.º ID SEC: 2 | 67 | 2160 | 110 | 303 |
| Epo3 N.º ID SEC: 3 | 85 | 105 | 119 | 392 |
| Epo4 N.º ID SEC: 4 | 112 | 6100 | ND | 342 |

1. La concentración de variantes EPO se determinaron por ELISA (Quantikine IVD Epo ELISA, DEP00, R&D Systems)
 2. Las muestras EPO-0, 1, 2 y 4 se diluyeron a 105 IU/ml en sup simulado (ajustado a una titulación Epo3). Epo0 - EPO natural expresado en el mismo sistema que el PCT de EPOs modificados.
 3. Todas las muestras se concentraron y dializaron por ultrafiltración contra PBS a una concentración final de 180

30

Todas las proteínas se detectaron por Western blot, como se ilustra en la Figura 2.

35

EJEMPLO 3

Actividad biológica de los polipéptidos EPO-CTP de la presente invención.

40

La prueba de bioactividad TF-1 representa la habilidad de las variantes EPO-CTP para unir su receptor y luego estimular la actividad, lo cual da como resultado la proliferación de la célula. Por lo tanto, esta prueba se utilizó como el primer paso en la evaluación de potencia biológica de los polipéptidos EPO-PCT de la presente invención.

45

MATERIALES Y MÉTODOS

50

Análisis de proliferación de célula Se realizó un ensayo de proliferación con la línea celular TF-1 midiendo los niveles de cepa celular MTT como una función de la actividad EPO (Kitamura *et al.*, Kitamura, T. et al. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates, Hammerling U. et al. In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11): 1455-1469 (1996). Las células TF-1 que crecían exponencialmente se lavaron dos veces, se colocaron en placas a aproximadamente 10^4 células/pocillo en placas de microtitulación, y se incubaron en un medio basal con una serie de dilución titulada de EPO (Recormon), EPO estándar (NIBSC estándar), rhEPO (MOD-7010), variantes MOD-701 (EPO-1, EPO-2, EPO-3 y EPO-4) durante 48 horas. 4 horas antes del ensayo de la proliferación de células, se agregó el reactivo MTT a los pocillos, y se midió la absorbancia por lector ELISA. Se obtuvo un valor de concentración de proteína calculada para

55

cada proteína variante a partir de la curva de respuesta de dosis estándar Epoetin (EPO) de Eprex.

RESULTADOS

5 La actividad biológica *in vitro* de polipéptidos EPO se determinó con una línea celular Epo dependiente, eritroleucemia humana TF-1 (DSMZ Cell Bank) Dong et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 339, Issue 1, 6 January 2006, págs.. 380-385. El ensayo MTT se realizó Hammerling U. et al. en un bioensayo *in vitro* para eritropoyetina humana basada en la estimulación de proliferación de una línea celular elitroide y análisis de microheterogeneidad dependiente de carbohidrato. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11): 1455-1469 (1996);, y se usó el estándar de laboratorio EPO para generar la curva estándar que fue calibrada contra el Estándar Internacional (Epo ampoule code 87/684 of N IBSC).

10 Los resultados se resumen en la tabla 4 a continuación. Los resultados indican que la potencia más alta lograda se logró al usar EPO 3 y EPO 0 en concentraciones de 2 y 0.5 IU/ml.

Tabla 4

15

| Eprex STD | Bioactividad TF-1 IU/ml | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------|--------|
| IU/ml | EPO 0 N.º ID SEC: 16 | EPO 1 N.º ID SEC: 1 | EPO 2 N.º ID de SEC: 2 | EPO 3 N.º ID de SEC: 3 | EPO 4 N.º ID de SEC: 4 | Recormon | EPO st |
| 20 2 | 4,93 | 2,32 | 2,13 | 6,91 | 3,55 | 3,44 | 7,40 |
| 0,5 | 1,60 | 0,76 | 0,53 | 1,34 | 0,84 | 0,87 | 1,53 |

25 **CONCLUSIÓN**

Como se resumió en la tabla 4 de arriba, los diferentes niveles de la potencia ejercida por los polipéptidos EPO-PCT, indican diferencias en la unión del receptor. Los polipéptidos EPO-PCT difieren del número de casetes PTC y la ubicación a la cual están fusionados. EPO-1 y EPO-2 contienen 1 secuencia PCT o 2 secuencias PCT en la terminal C de EPO, mientras que EPO-3 contiene 1 PCT en la terminal N y 2 secuencias PCT en la terminal C. EPO-4 es un dímero de dos moléculas EPO ligadas por la secuencia PCT. EPO-3 demostró un nivel de potencia algo similar a WT-EPO, mientras que EPO-1 y EPO-4 fueron cerca de 50 % menos potentes que WT-EPO y la potencia EPO-2 fue de incluso menos del 50%.

35 **EJEMPLO 4**

Evaluación de los polipéptidos EPO-PCT de la presente invención usando un modelo de ratón

40 Después de realizar el experimento para comparar la bio-actividad de los polipéptidos EPO-PCT de la presente invención EPO comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

45 **Animales:**

| | |
|------------------------|--|
| Especies/Cepas: | ICR o CD-1 ratón de cualquier sexo de aproximadamente 20-25g |
| Tamaño de grupo: | n=7 |
| 50 N.º grupos: | 9 |
| N.º total de animales: | n=63 |

Diseño experimental del estudio: El experimento se configuró como se resumió en la Tabla 5 a continuación.

55

Tabla 5

| N.º grupo | N.º de ratones por grupo | TRATAMIENTO | | Régimen de dosis |
|-----------|--------------------------|--------------------|----------------|------------------|
| | | Compuesto | Nivel de dosis | |
| 1 | n=7 | Vehículo (control) | 0 | 1 x semana |
| 2 | | SIMULADO | | |
| 3 | | MOD-7010 | 15 mg/kg | |
| 4 | | MOD-7011 | | |
| 5 | | MOD-7012 | | |
| 6 | | MOD-7013 | | |
| 7 | | MOD-7014 | | |
| 8 | | rhEPO comercial | 15 mg/kg | 3 x semana |
| 9 | | | 5 mg/kg | |

20 **Tratamiento animal:** Se administró a todos los animales cualquiera de los controles o los polipéptidos del EPO de prueba de la presente invención por inyección en bolo. El volumen de inyección no excedió 10 ml/kg. La longitud del experimento fue de 22 días. Se realizó diariamente una revisión de morbilidad y mortalidad.

25 **Conteo reticulocito y examen hematocrito (hct):** El conteo reticulocito se llevó a cabo en todos los animales de prueba en el día 2 y 14 horas después del 1^{er} vehículo respectivo o inyección de tratamiento. Se determinó el HCT en todos los animales una vez antes del tratamiento animal ("0" control inicial) y 24 horas después del 1^{er} vehículo respectivo o inyección de tratamiento, y después dos veces por semana hasta el término del estudio (día 22).

RESULTADOS

30 Los resultados hematocritos que se ilustran en la figuras 3-5 mostraron que EPO 3 tiene el porcentaje de hematocrito más alto desde los valores iniciales en comparación con el EPO 1, EPO 2, Recormon 1, Recormon 3, rhEPO y vehículo. Los resultados que demostraron el porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con los polipéptidos EPO-PCT se resumen en la tabla 6 más abajo. Estos resultados muestran que EOP-3 son el estimulador más potente de eritropoyetina.

Tabla 6

| Días | % reticulocitos | |
|---------------------|-----------------|------|
| | 2 | 14 |
| Control | 3,72 | 3,46 |
| | 1,08 | 0,8 |
| Simulado | 3,5 | 3,64 |
| | 0,6 | 1,13 |
| 7010 N.o ID SEC: 16 | 3,5 | 3,9 |
| | 0,6 | 1,54 |
| 7011 N.o ID SEC: 1 | 3,52 | 1,94 |
| | 1,38 | 1,08 |
| 7012 N.o ID SEC: 2 | 3,82 | 3,0 |
| | 1,02 | 0,88 |

| | % reticulocitos | |
|--------------------|-----------------|------|
| | 2 | 14 |
| 7013 N.o ID SEC: 3 | 2,66 | 5,20 |
| | 0,97 | 2,96 |
| 7014 N.o ID SEC: 4 | 3,48 | 3,82 |
| | 0,71 | 0,90 |
| Recormon 1/W | 3,23 | 3,27 |
| | 0,73 | 0,59 |
| Recormon 3/w | 4,13 | 4,24 |
| | 1,21 | 1,14 |

CONCLUSIÓN

El experimento *in vivo* fue diseñado para medir dos parámetros; el primero fue para medir los parámetros de eritropoyetina como un porcentaje de reticulocitos y aumentar los niveles de hemoglobina, BBC y hemacroticos. El segundo fue para medir la durabilidad de la actividad biológica de cada variante al inyectar dosis una vez por semana.

Se observó un rendimiento superior de EPO-3 en su habilidad para estimular la eritropoyetina en los ratones normales.

EJEMPLO 5

Comparación de los polipéptidos EPO-PCT de la presente invención a Aranesp.

El siguiente experimento se realizó para comparar la actividad biológica de una dosis en bolo simple de algunos polipéptidos EPO-PCT de la presente invención, EPO comercial y Aranes. Aranes es una eritropoyetina recombinante comercial de acción prolongada en la cual se introdujeron dos mutaciones de sitio, lo que produjo dos sitios adicionales de N-glicosilación y un aumento en el número de residuos de ácido siálico incorporado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Especies/Cepa: Ratones femeninos CD-1 de cualquier sexo de aprox. 20-25 g.

Tamaño de grupo: n=3

Diseño experimental del estudio: El experimento se configuró como se resume en la

Tabla 7 a continuación.

| N.º grupo | Artículo de prueba | animales/grupo /tiempo-punto | Conc. solución de dosis | Volumen de dosis (mL/kg) | Tiempo-puntos* (horas después de la |
|-----------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| 1 | MOD-7010 N.º de ID SEC: | 3 | 1,5 | 10 | 0 (Predosis), 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 hr de administración después de |
| 2 | MOD-7010 N.º de ID SEC:3 | 3 | 1,5 | 10 | 0,25; 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 hr administración después de la dosis |

| N.º grupo | Artículo de prueba | animales/grupo /tiempo-punto | Conc. solución de dosis (mg/mL) | Volumen de dosis (mL/kg) | Tiempo-puntos* (horas después de la administración) | |
|-----------|--------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---|---|
| 5 10 | 3 | Aranes | 3 | 1,5 | 10 | 0,25; 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 Hr administración después de la dosis |

Tratamiento animal: Se administró a todos los animales cualquiera de los controles o los polipéptidos del EPO de prueba de la presente invención por inyección en bolo. El volumen de inyección no excedió 10 ml/kg. La longitud del experimento fue de 14 días. Se realizó diariamente una revisión de morbilidad y mortalidad.

15 **Conteo reticulocito y examen hematocrito (hct):** Se realizó el conteo de reticulocitos y el examen hematocrito como se describió más arriba.

RESULTADOS

20 Los resultados se ilustran en la figura 6-9. Después de una inyección I.V. de 15 mg/kg de EPO 3, todos los tres parámetros de sangre asociados con la eritropoyetina, p.ej. número de reticulocitos, nivel de hemoglobina y hematocrito, mejoraron en relación a aquellos obtenidos con dosis similares inyectadas de rhEPO o Aranes.

EJEMPLO 6

Comparación de la farmacocinética de polipéptidos EPO-PCT de la presente invención a Aranes.

El siguiente experimento se realizó para comparar la farmacocinética del polipéptido EPO-PCT de la presente invención, EPO comercial y Aranes.

MATERIALES Y MÉTODOS

35 Las muestras de suero se analizaron para determinar niveles de concentración específica para cada muestra. Los datos de concentración y tiempo-punto se procesaron usando análisis sin compartimientos WinNonLin. Los parámetros determinados incluyen: AUC, CL, Ke, t1/2, Cmax, Tmax, y Vdz.

Las concentraciones de suero se determinaron usando kits ELISA en paralelo. La concentración de suero EPO-3 se midió usando StemCell Elisa en comparación a concentración de suero EPO-0 y Aranes los cuales fueron determinados usando el sistema ELISA de R&D

RESULTADOS

40 Los resultados del análisis farmacocinéticos se resumen en la tabla 8 a continuación. Estos resultados muestran que EPO 3 presentó medidas farmacocinéticas favorables, como se indica, por ejemplo, en las medidas AUC, t1/2 y Cmax. Las medidas Tmax fueron iguales a EPO-0, EPO-3, y Aranes.

Tabla 8

| Parámetros | Unidades | EPO-0 | EPO-3 | Aranes |
|-----------------|-----------|--------|---------|--------|
| AUClast | hr*mlU/mL | 31739 | 306072 | 178661 |
| CL [^] | mL/hr/kg | 1,1152 | 0,2188 | 0,1207 |
| Ke | 1/hr | 0,157 | 0,0529 | 0,0639 |
| t1/2 | hr | 4,4139 | 13,1141 | 10,84 |
| Cmax | mlU/mL | 10766 | 16466 | 13266 |
| Tmax | Hr | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Vdz | mL/kg | 7,1017 | 4,1394 | 1,8877 |

Los resultados del análisis de concentración de suero se ilustraron en la figura 9. Estos resultados mostraron que EPO-3 eran todavía detectables en el suero después de aproximadamente 190 horas. Ambos, EPO-0 y Aranes no se detectaron en el suero después de aproximadamente 140 horas y 50 horas, respectivamente.

5

CONCLUSIÓN

El espacio de EPO-3 (MOD-7013) desde la sangre de ratones CD-1 fue más lenta que la del rhEPO o Aranes. Los tiempos calculados de media vida fueron: rhEPO - 4.41 h; Aranes - 0.84 h; y MOD-7013 - 13.11 h.

10

EJEMPLO 7 (COMPARATIVO)

Generación de construcciones GH

15

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sintetizaron cuatro clones hGH (variantes de proteína 20kD). Los fragmentos XbaI-NotI que contienen secuencias de hGH desde cuatro variantes se ligaron al vector de expresión eucariota pCI-dhfr previamente digeridas con XbaI-NotI. Se preparó ADN de los 4 clones (401-0, 1, 2, 3 and 4). También se sintetizó otro clon parcial hGH (1-242 bp) a partir de una proteína 22kD. Los cebadores se ordenaron de Sigma-Genosys. Las secuencias de cebador usadas para generar los polipéptidos hGH-PCT de la presente invención se resumen en la tabla 9 a continuación.

20

Tabla 9

25

| Número básico | N.º ID SEC | Secuencia | Sitio de restricción (subrayado en |
|-----------------|------------|---|------------------------------------|
| 25 | 27 | 5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3' | XbaI |
| 32 ^R | 28 | 5' ACAGGGAGGTCTGGGGGTTCTGCA 3' | |
| 33 | 29 | 5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3' | |
| 4 ^R | 30 | 5' CCAAACCTCATCAATGTATCTTA 3' | |
| 25 | 31 | 5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3' | XbaI |
| 35 ^R | 32 | 5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3' | |
| 34 | 33 | 5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTCG 3' | |
| 37 ^R | 34 | 5' <u>ACGCGGCCGC</u> ATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3' | NotI |
| 39 ^R | 35 | 5' <u>GCGGCCGCGG</u> ACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCC 3' | |

40

Construcción de 402-0-p69-1 (hGH) N.º ID SEC: 36: MOD-4020 es la hormona de crecimiento humano recombinante (sin PCT) que se preparó para usar el control descrito en los siguientes experimentos.

45

Se realizaron tres reacciones PCR. La primera reacción se llevó a cabo con cebador 25 y cebador 32R, y ADN plásmido de 0606114 (clon parcial de hGH 1-242 bp) como plantilla, como resultado de la amplificación PCT, se formó un producto 245 bp.

La segunda reacción se llevó a cabo con cebador 33 y cebador 4R, y ADN plásmido de 401-0-p57-2 como plantilla; como un resultado de la ampliación PCR, se formó un producto 542 bp.

50

La última reacción se llevó a cabo con cebadores 25 y 4R y una mezcla de productos de las dos reacciones previas como plantilla, como resultado de la amplificación por PCR, se formó y ligó un producto 705 bp en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI-NotI que contiene la secuencia hGH-0 se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr. El vector se transfeció

en las células DG-44. Las células crecieron en medio libre de proteínas.

Construcción de 402-1-p83-5 (hGH-PCT) N.º ID SEC: 37 y 402-2-p72-3 (hGC-PTCx2) - N.º ID SEC: 38: MOD-4021 es una hormona de crecimiento humano recombinante que se fusionó a 1 copia del péptido de la terminal C de la cadena beta de la gonadotropina coriónica humana (PCT). El casete PCT del MOD-4021 se unió al término C (un casete). MOD-4021 es una hormona de crecimiento humano recombinante que se fusionó a 2 copias del péptido de la terminal C de la cadena beta de la gonadotropina coriónica humana (PCT). Los dos casetes PCT del MOD-4022 se unieron al término C (dos casetes).

La construcción de hGH-PCT y hGH-PCT-PCT se realizó de la misma forma que la construcción de hGH-0. pCl-dhfr-401-1-p20-1 (hGH*-ctp) y pCl-dhfr-401-2-p21-2 (hGH*-ctp x2) se usaron como plantillas en la segunda reacción PCT.

MOD-4021 y MOD-4022 se expresaron en células DG-44 CHO. Las células crecieron en un medio libre de proteínas. El peso molecular de MOD-4021 es ~30,5Kd debido a que hGH tiene un peso molecular de 22 Kd mientras que cada casete "PCT" contribuye

8,5 Kd al peso molecular global (véase la figura 10). El peso molecular de MOD-4022 es ~39 Kd (véase la figura 10).

Construcción de 402-3-p81-1 (PCT-hGH-PCT-PCT) N.º ID SEC: 39 y 402-4-p82-9(CTP*hGH-CTP-CTP)

N.º ID SEC: 40: MOD-4023 es una hormona de crecimiento humano recombinante que se fusionó a 3 copias del péptido de la terminal C de la cadena beta de la gonadotropina coriónica humana (PCT). Los tres casetes PCT de MOD-4023 se unieron a un término N (un casete) y el término C (dos casetes). MOD-4024 es una hormona de crecimiento humano recombinante que se fusionó a 1 copia truncada y 2 copias completas del péptido de la terminal C de la cadena beta de la gonadotropina coriónica humana (PCT). El casete PCT truncado de MOD-4024 se unió al término N y dos casetes PCT se unieron al término C (dos casetes).

Se realizaron tres reacciones PCR. La primera reacción se llevó a cabo con cebador 25 y cebador 32R, ADN plásmido de p401-3-p12-5 o 401-4-p22-1 como plantilla, como resultado de la amplificación PCT, se formó un producto 265 o 220 bp. La segunda reacción se llevó a cabo con cebador 34 y cebador 37R, y ADN plásmido de TA-hGH-2-q65-1 como plantilla; como resultado de la amplificación PCR, se formó un producto 695 bp. La última reacción se llevó a cabo con cebadores 25 y 37R y una mezcla de los productos de las dos anteriores reacciones como plantilla, como resultado de la amplificación PCR, se formó y ligó un producto 938 o 891 bp en el vector de clonación TA (Invitrogen, catalogo K2000-01). XbaI - NotI que contiene la secuencia hGH se ligó en nuestro vector de expresión eucariota pCl-dhfr.

MOD-4023 y MOD-4024 se expresaron en células DG-44 CHO. Las células crecieron en medio libre de proteínas. El peso molecular de MOD-4023 es ~47.5Kd (consultar figura 10) y el peso molecular de MOD-4024 es ~43.25Kd (consultar figura 10).

Construcción de 402-6-p95a-8 (PCT-hGH-PCT-PCT) N.º ID SEC: 41: La construcción de hGH-6 se llevó a

cabo en la misma forma que la construcción de hGH-3. pCl-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp) se usó como plantilla en la segunda reacción PCR.

Construcción de 402-5-p96-4 (PCT-hGH) N.º ID SEC: 42: La reacción se llevó a cabo con cebadores 25 y 39R y ADN plásmido de pCl-dhfr-ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8) como plantilla, como resultado de la amplificación PCR, se formó y ligó un producto 763 bp en el vector de clonación TA (Invitrogen, catalogo K2000-01). Fragmento XbaI - NotI que contiene la secuencia ctp-hGH se ligó en nuestro vector de expresión eucariota pCl-dhfr para producir el clon 402-5-p96-4.

EJEMPLO 8 (COMPARATIVO)

Pruebas de bioactividad in vivo de polipéptidos hGH-PCT de la presente invención.

El siguiente experimento se llevó a cabo para probar la posibilidad de actividad biológica a largo plazo de polipéptidos hGH-PCT en comparación con el GH humano recombinante y MOD-4020.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas hembras hipofisectomizadas (60 -100 g) recibieron una inyección semanal S.C. de 21,7 mg de polipéptidos hGH-PCT o una inyección diaria de 5 mg S.C. de rhGH comercial.

El peso se midió en todos los animales antes del tratamiento, 24 horas después de la primera inyección

y luego cada otro día hasta el final del estudio en el día 21. Cada punto representa el porcentaje de ganancia de peso promedio ((Día peso 0- último día de peso)/peso día 0). La ganancia de peso promedio se normalizó contra una inyección diaria de hGH comercial. El programa de tratamiento se resume en la tabla 10.

5 **Tabla 10**

| N.º | Droga | N | Ruta | Programa de tratamiento | Dosis equimolar (mg/rat) | Dosis acumulada (mg/rat) | Vol. de dosis (ml) | |
|-----|-------|----------------------------|------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|------|
| 10 | 1 | Vehículo | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S | NC | NC | 0,25 |
| | 2 | Simulado | 7 | s.c | días 1, 7 y 13: 1/S | NC | NC | 0,25 |
| 15 | 3 | MOD-4020 N.º ID SEC: 36 | 7 | s.c | días 1, 7 y 13; 1/S | 21,7 | 65 | 0,25 |
| 20 | 4 | MOD-4021 N.º ID SEC: 37 | 7 | s.c. | days 1, 7 and 13,1/W | 21,7 | 65 | 0,25 |
| | 5 | MOD-4022 N.º ID SEC: 38 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S | 21,7 | 65 | 0,25 |
| 25 | 6 | MOD-4023 N.º ID SEC: 39 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S | 21,7 | 65 | 0,25 |
| 30 | 7 | MOD-4024 N.º ID SEC: 40 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S | 21,7 | 65 | 0,25 |
| 35 | 8 | Comercial hGH v.1 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S | 21,7 | 65 | 0,25 |
| 40 | 9 | Comercial hGH v.1 | 7 | s.c. | día 1-13; d/W | 5 | 65 | 0,25 |

45

RESULTADOS

Los resultados se resumen en figura 11. Estos resultados muestran que MOD-4023 (N.º de ID SEC: 39) y Aranesp.

50 N.º ID SEC: 40) indudido sobre ganancia de peso 120% comparado a rhGH comercial el cual indujo una ganancia de peso 100%.

CONCLUSIÓN

3 dosis semanales (días de inyecciones;1, 7, y 13) de 21.7mg de MOD-4023 (N.º ID SEC: 39) y Aranesp.
N.º ID SEC: 40) indujo un 30% mas de aumento de peso en ratas hipofisectoizadas en comparación a
5 rhGH comercial inyectado en la misma dosis acumulada la cual se administró una vez por día a una
dosis de 5 mg por 13 días.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FARES, Fuad FIMA, Udi Eyal

5 <120> Polipéptidos de larga duración de acción y procedimientos para producirlos y administrarlos

<130> P-9520-PC1

<140> PCT

10 <141> 2007-02-05

<160> 47

<170> PatentIn version 3.3

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

25 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

30 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

35 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

40 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

45 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220

<210> 2
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

10 **Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu**
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

15 **Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu**
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

20 **Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu**
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

25 **Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly**
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

30 **Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile**
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

35 **Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp**
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

40 **Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser**
210 215 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225 230 235 240

45 **Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln**
245

<210> 3
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

5 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
 20 25 30
 10 Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
 35 40 45
 Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
 50 55 60
 15 Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
 85 90 95
 20 Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
 100 105 110
 Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
 115 120 125
 25 Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
 130 135 140
 Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
 145 150 155 160
 30 Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
 165 170 175
 Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
 180 185 190
 Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
 195 200 205
 35 Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
 210 215 220
 Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 40 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
 245 250 255
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 260 265 270
 45 Pro Ile Leu Pro Gln
 275

<210> 4
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 4

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

50

Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val
 305 310 315 320

Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln
 325 330 335

5

Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg
 340 345 350

Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn
 355 360 365

10

Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr
 370 375 380

Gly Asp Arg
 385

15

<210> 5

<211> 221

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 5

25

30

35

40

45

50

1 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 5 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
 10 Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
 15 Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
 20 Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
 25 Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
 30 Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
 35 Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
 40 Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
 45 Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
 50 Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
 55 Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
 60 Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
 65 Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 70 210 215 220

<210> 6

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

5 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
 20 25 30
 10 Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
 35 40 45
 Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
 50 55 60
 15 Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
 85 90 95
 20 Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
 100 105 110
 Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
 115 120 125
 25 Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
 130 135 140
 Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
 145 150 155 160
 30 Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
 165 170 175
 Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
 180 185 190
 35 Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
 195 200 205
 Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
 210 215 220 225
 40 Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 245
 <210> 7
 <211> 25
 45 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 7
 50 aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25
 <210> 8
 <211> 32

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 5 <400> 8
 attgcgccg cggatccaga agaccttat tg 32
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 9
 taaatattgg ggtgtccgag ggccc 25
 15
 <210> 10
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 10
 ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at 32
 <210> 11
 25 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 30 <400> 11
 tgcggccgcg gatccttatc tgtcccctgt cctgc 35
 <210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 12
 gccctgctgt cggaagc 17
 40
 <210> 13
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 45 <400> 13
 attgcgccg cggatccaga agaccttat tg 32
 <210> 14
 <211> 32
 50 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>

<223> Secuencia corta artificial
 <400> 14
 ctttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc 32
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>

5

<223> Fue divertido? extraño? Dímelo a mí
 <400> 15
 cctgggctcc tcttctcaa aggc 24
 <210> 16
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

10

15

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

20

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

25

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

35

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

40

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

45

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

50

<210> 17
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial


```

<210> 21
<211> 873
<212> DNA
5  <213> Homo sapiens
    <400> 21

tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct    60
tctgtcgttc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tectcaaagg cccctcccc   120
gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc   180
10  cccaccacgc ctcctctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga   240
ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt   300
cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt   360
15  agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctggt   420
ggcgaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg   480
ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc   540
tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact   600
cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg   660
20  caggacaggg gacagatcct ctctctcaa gggccctccc ccgagccttc caagtccttc   720
ccgactcccc gggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc   780
tcctccatcc ctgccatccc cctcccggct gcctggcccc tctgacaccc ctatcttgcc   840
tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc                                873

25  <210> 22
    <211> 221
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 22

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

```

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140
 5 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175
 10 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190
 15 Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 195 200 205
 20 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 210 215 220
 25 <210> 23
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 30 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 35 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 35 40 45
 40 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60
 45 Val Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 65 70 75 80
 50 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 100 105 110
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 115 120 125
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 5 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 165 170 175
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 180 185 190
 10 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 195 200 205
 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 210 215
 <210> 24
 15 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 20
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 25 Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 30 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 35 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 40 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 45 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 50 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 25

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

5 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

10
 <210> 26
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 26

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe S
 1 5 10 15

20 Thr Thr Ala Leu Ser
 20

25 <210> 27
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 27

30 ctctagagga catggccac 19
 <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 28

40 acagggaggt ctgggggttc tgca 24
 <210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial

45 <400> 29
 tgagaacct ccagacctcc ctgtgc 26
 <210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 50 <213> Artificial
 <220>

<223> Secuencia corta artificial
 <400> 30

5 ccaaactcat caatgtatct ta 22
 <210> 31
 <211> 19
 <212> DNA <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 31
 10 ctctagagga catggccac 19
 <210> 32
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 32
 15 cgaactcctg gtaggtgtca aaggc 25
 <210> 33
 <211> 25
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 33
 25 gcctttgaca cctaccagga gttcg 25
 <210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 34
 acgcgccgc atccagacct tcatcactga ggc 33
 <210> 35
 <211> 34
 35 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia corta artificial
 <400> 35
 40 gcggccgcg actcatcaga agccgcagct gccc 34
 <210> 36
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 36
 50

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

<210> 37
 <211> 245
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37

40 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30

45

50

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45
 5 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 65 70 75 80
 10 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 100 105 110
 15 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 115 120 125
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 130 135 140
 20 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 165 170 175
 25 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 180 185 190
 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 195 200 205
 30 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
 210 215 220
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 225 230 235 240
 35 Pro Ile Leu Pro Gln
 245

<210> 38
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38

40

45

50

Met **Ala** **Thr** **Gly** **Ser** **Arg** **Thr** **Ser** **Leu** **Leu** **Leu** **Ala** **Phe** **Gly** **Leu** **Leu**
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 20 25 30
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 35 40 45
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 50 55 60
 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 65 70 75 80 85 90 95
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 100 105 110
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 115 120 125
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 130 135 140
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 145 150 155 160
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 165 170 175
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 180 185 190
 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 195 200 205
 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
 210 215 220
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 225 230 235 240
 Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 245 250 255
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 260 265 270
Gln
 <210> 39
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 39

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 5 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
 20 25 30
 Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
 35 40 45
 10 Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 50 55 60
 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
 65 70 75 80
 15 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
 85 90 95
 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
 100 105
 20 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
 115 120 125
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 130 135 140
 25 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 165 170 175
 30 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
 180 185 190
 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
 195 200 205
 35 Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
 225 230 235 240
 40 Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 245 250 255
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 260 265 270
 45 Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 275 280 285
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 290 295 300

<210> 40

<211> 285

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40

5 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
 20 25 30

10 Pro Pro Pro Ser Leu Pro Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 35 40 45

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
 50 55 60

15 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
 65 70 75 80

Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
 85 90 95

20 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
 100 105 110

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 115 120 125

25 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 130 135 140

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 145 150 155 160

30 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
 165 170 175

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
 180 185 190

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
 195 200 205

35 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
 210 215 220

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 225 230 235 240

40 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 245 250 255

Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 260 265 270

45 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 275 280 285

<210> 41
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 41

50

5 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

10 Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
50 55 60

15 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
85 90 95

20 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
100 105 110

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
115 120 125

25 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
130 135 140

Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
145 150 155 160

30 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
165 170 175

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
180 185 190

35 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
195 200 205

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
210 215 220

40 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
225 230 235 240

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
245 250 255

45 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
260 265 270

Gln

50 <210> 42
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

5 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 1 5 10 15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30
10 Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45
Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
50 55 60
15 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
65 70 75 80
Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
85 90 95
20 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
100 105 110
Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
115 120 125
25 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
130 135 140
Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
145 150 155 160
30 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
165 170 175
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
180 185 190
35 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
195 200 205
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
210 215 220
40 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
225 230 235 240
Gly Ser Cys Gly Phe
245

<210> 43

<211> 12

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial short protein

<400> 43

50 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
1 5 10

<210> 44

<211> 853
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 44

5
 10
 15
 20

```

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg      60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcggcag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct      120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac      180
catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct      240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag      300
cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa      360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgcctgctgat      420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta      480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac      540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta      600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct      660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagacctc ctgaggatcg tgcagtgcag      720
aagcgtggag ggcagctgct gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc      780
ctccccaagc aggctgcctg ggcccctcga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc      840
tggatgcccc cgc                                             853
    
```

<210> 45
 <211> 937
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 45

25
 30
 35
 40
 45

```

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg      60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcggcag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct      120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac      180
catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct      240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag      300
cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa      360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgcctgctgat      420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta      480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac      540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta      600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct      660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagacctc ctgaggatcg tgcagtgcag      720
aagcgtggag ggcagctgct gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc      780
ctccccaagc aggctgcctg ggcccctcga cacaccaatc ctgccacaga gcagctcctc      840
taaggcccct cctccatccc tgccatcccc ctcccggctg cctggcccct ctgacacccc      900
tatcctgcct cagtgatgaa ggtctggatg cggccgc                                             937
    
```

50
 55

<210> 46
 <211> 889
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 46

5 tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
 cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccagacct 120
 gcccttcccc accatccccc tgagcaggct gttcgacaac gccatgctga gggctcacag 180
 gctgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccaaagga 240
 gcagaagtac agcttctctg agaaccccca gacctcctg tgcttcagcg agagcatccc 300
 10 cccccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc 360
 cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgcca 420
 cagcctgggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga 480
 gggcatccag acctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt 540
 caagcagacc tacagcaagt tcgacacca cagccacaac gacgacgcc tgctgaagaa 600
 15 ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcctgaggat 660
 cgtgcagtg cagaagcgtg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggccctcc 720
 cccgagcctg ccctcccca gaggctgcc tgggccctcc gacacacca tcctgccaca 780
 gagcagctcc tctaaggccc ctctccatc cctgccatcc ccctcccggc tgctggccc 840
 20 ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgatg aaggtctgga tgcggccgc 889

<210> 47
 <211> 217
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 47

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

5 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

10 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

15 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
210 215

20

25

30

35

40

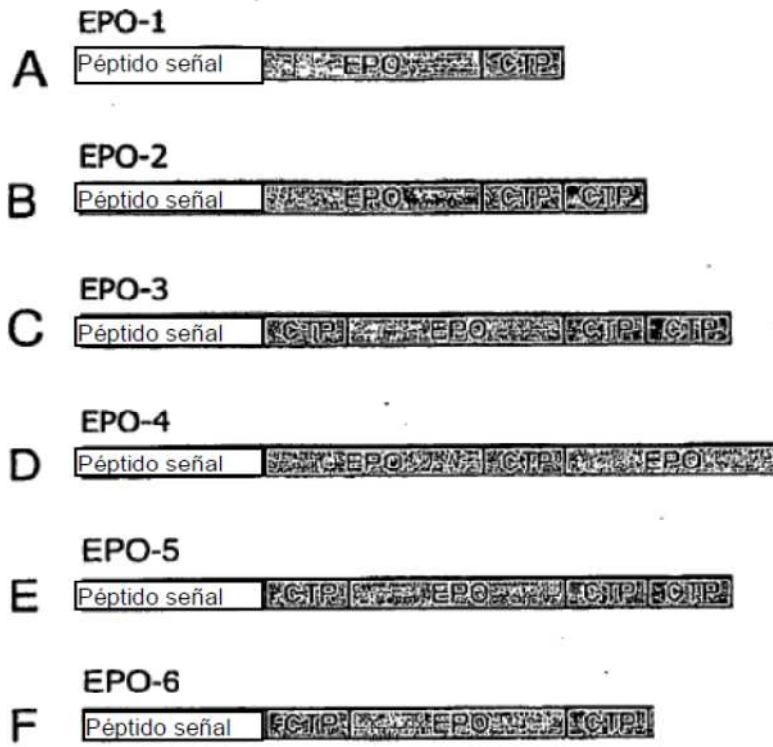
45

50

Reivindicaciones

- 5 1. Un polipéptido que se compone de un péptido de interés, en donde una gonadotropina coriónica de péptido con carbonilo terminal (PCT) está unida a un termino amino de dicho péptido de interés, y una segunda y tercera terminal carboxilo de gonadotropina coriónica está unida
- 10 al termino carboxilo de dicho péptido de interés, en donde dicho péptido de interés es un péptido de eritropoyetina (EPO), en donde el PCT es de una subunidad beta de la gonadotropina coriónica, en donde el PCT se compone de la secuencia de aminoácido SSSSKAPPPS, y en donde el péptido EPO estimula la eritropoyetina.
- 15 2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde dicho péptido de interés es glicosilado.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho péptido de interés es no glicosilado.
- 20 4. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde la secuencia de dicho péptido EPO se compone de una secuencia de aminoácido seleccionado desde las secuencias previstas en N.º ID SEC: 3 y el N.º ID SEC: 6.
- 25 5. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la secuencia de al menos una terminal carboxilo de gonadotropina coriónica se compone de una secuencia de aminoácido seleccionada desde las secuencias previstas en N.º ID SEC: 17 y N.º ID SEC: 18.
- 30 6. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la secuencia de al menos una gonadotropina coriónica con péptido con carbonilo terminal se truncó, y en donde dicho péptido con carboxilo terminal se compone de al menos un sitio de glicosilación.
7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos una gonadotropina coriónica de péptido con carbonilo terminal es glicosilada.
- 35 8. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se componen además de un péptido de señal.
9. El polipéptido de la reivindicación 8, en donde el péptido de señal se compone de una secuencia de aminoácido previstas en N.º ID SEC: 19.
- 40 10. Una composición farmacéutica que se compone del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Un polinucleótidos que codifican el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 12. El polinucleótido de la reivindicación 11, en donde la secuencia del ácido nucleico se compone de la secuencia prevista en N.º ID SEC: 21.
13. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en donde dicho polipéptido se compone además de un péptido de señal.
- 50 14. Un vector de expresión que se compone del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.
- 55 15. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.
16. Una composición farmacéutica que se compone del polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, el vector de expresión de la reivindicación 14, la célula de la reivindicación 15 o su combinación.

- 5
17. Un método para mejorar la media vida biológica y retención de una actividad biológica de un péptido de interés, que se compone del paso de unir una primera gonadotropina coriónica de péptido con terminal carboxi (PCT) a la terminal amino de dicho péptido de interés y una gonadotropina coriónica con péptido de terminal carboxi a la terminal carboxi de dicho péptido de interés, mejorando por lo tanto la semivida biológica de dicho péptido de interés, en donde dicho péptido de interés es eritropoyetina (EPO), en donde el PCT es de una subunidad beta de la gonadotropina coriónica, en donde el PCT se compone de la secuencia de aminoácido SSSSKAPPPS, y en donde el péptido EPO estimula la eritropoyetina.
- 10
18. El método de la reivindicación 17, donde la secuencia de al menos una terminal carboxilo de gonadotropina coriónica se compone de una secuencia de aminoácido seleccionada desde las secuencias previstas en N.º ID SEC: 17-18.
- 15
19. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el polinucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para usar el tratamiento o la reducción de la incidencia de anemia.
- 20
20. El polipéptido o el polinucleótidos para el uso de acuerdo a la reivindicación 19, en donde la secuencia de al menos una terminal carboxilo de gonadotropina coriónica se compone de una secuencia de aminoácido seleccionada desde las secuencias previstas en N.º ID SEC: 17-18.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50



FIGURAS 1 A-F

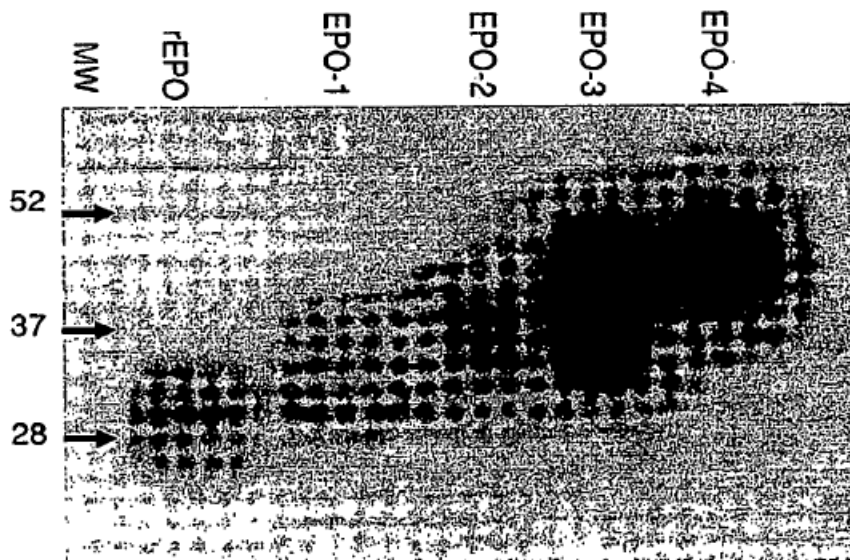


FIGURA 2

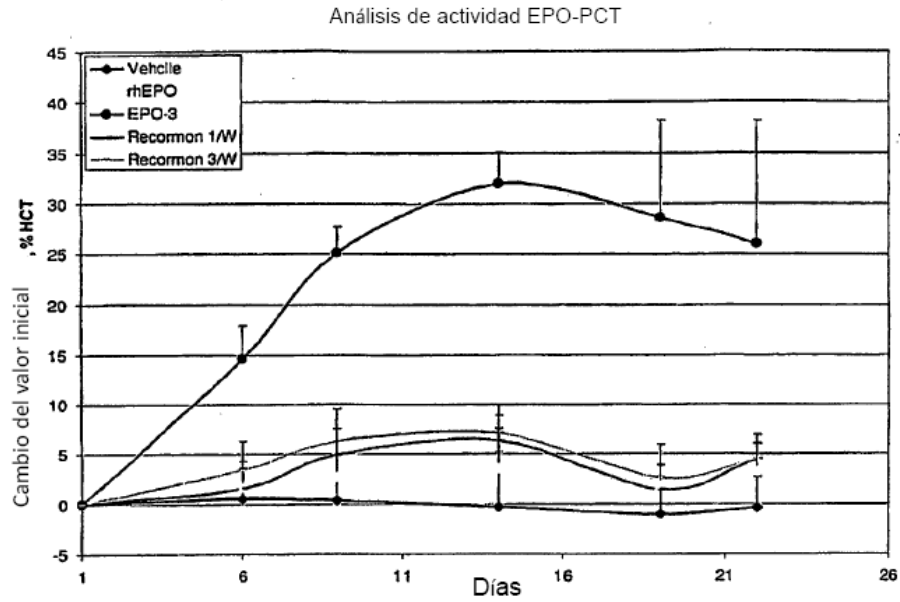


FIGURA 3

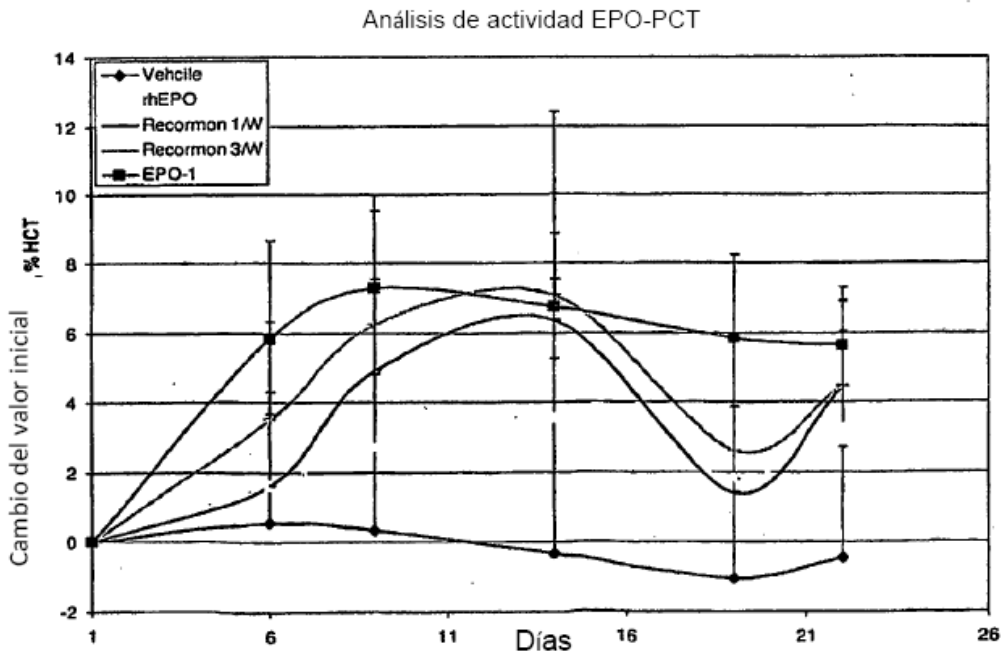


FIGURA 4

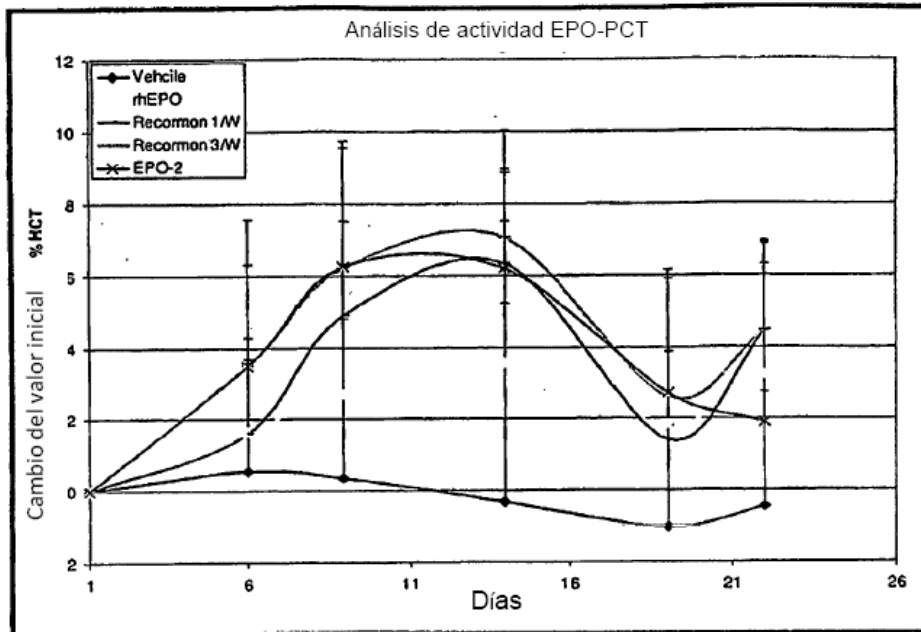


FIGURA 5

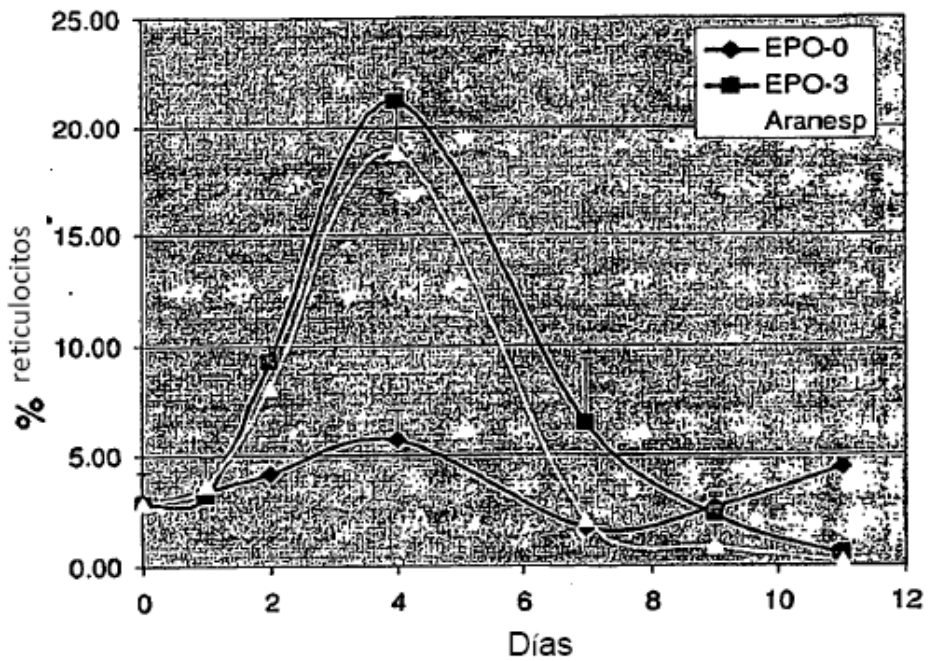


FIGURA 6

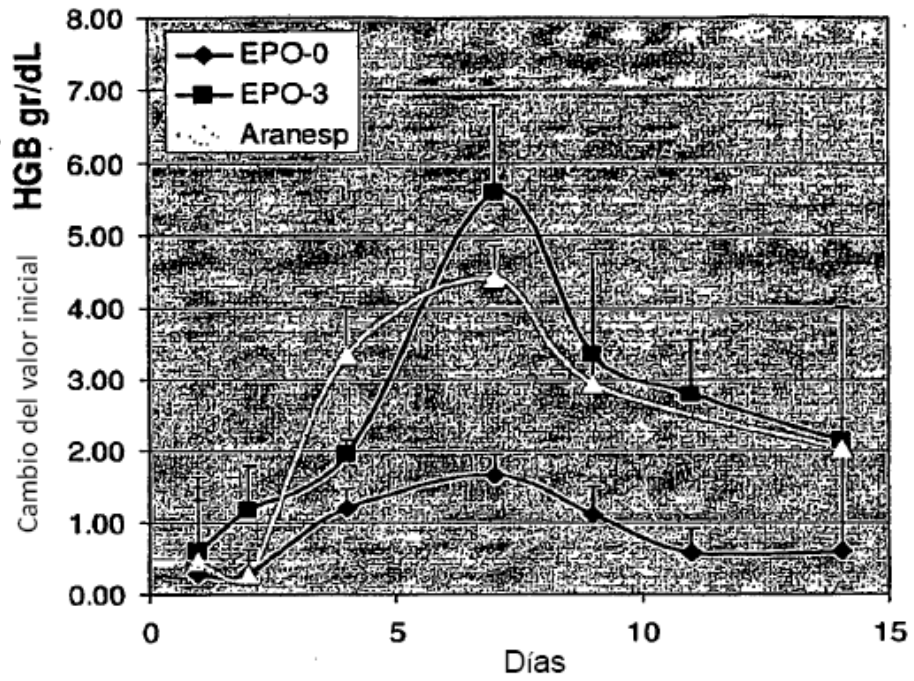


FIGURA 7

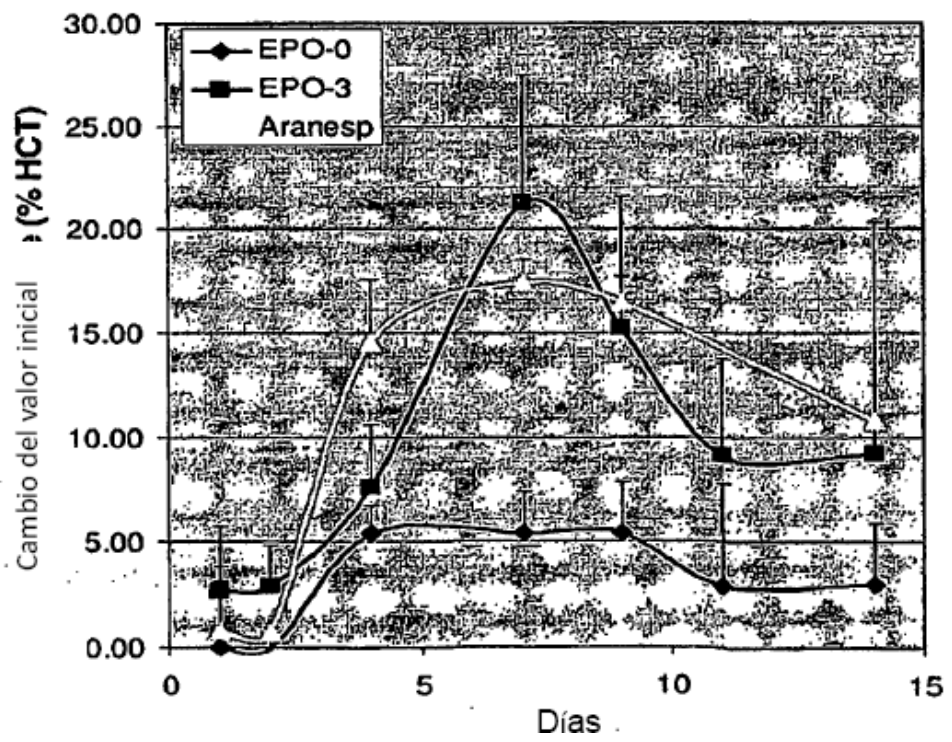


FIGURA 8

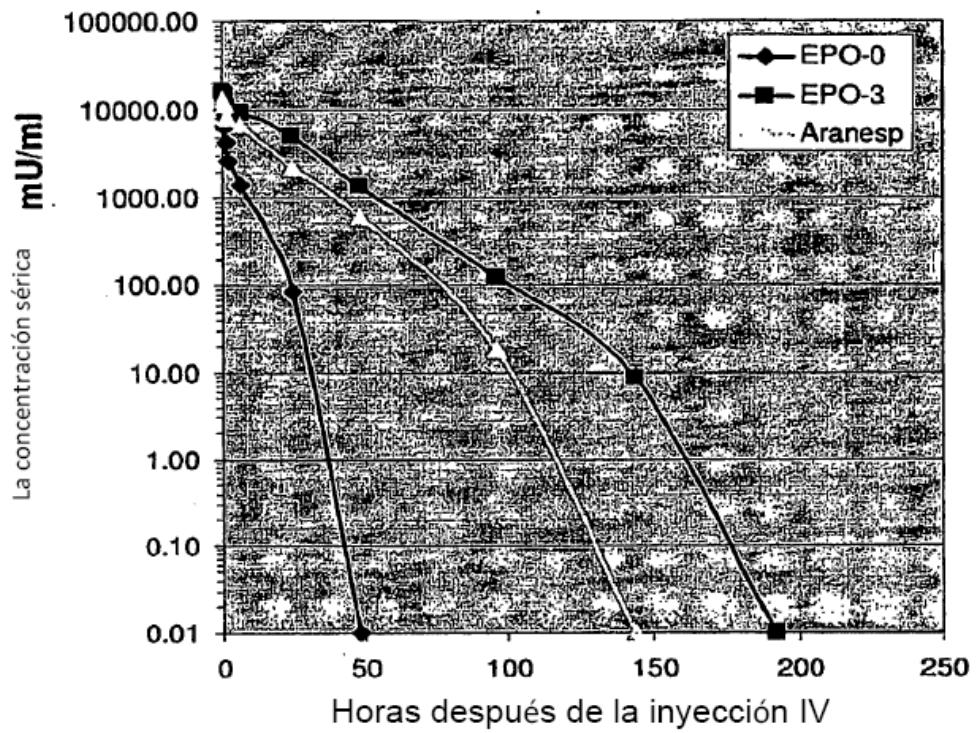


FIGURA 9

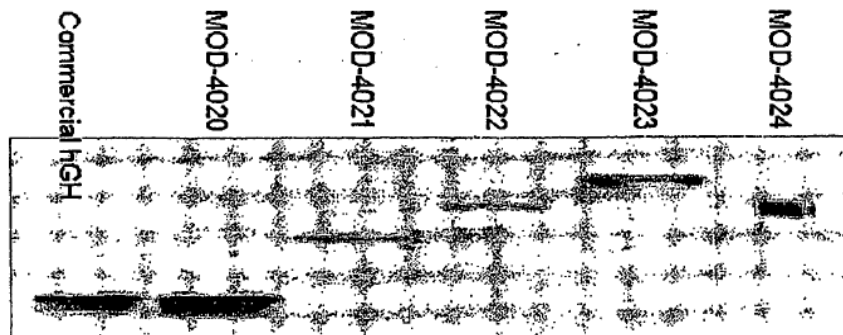


FIGURA 10

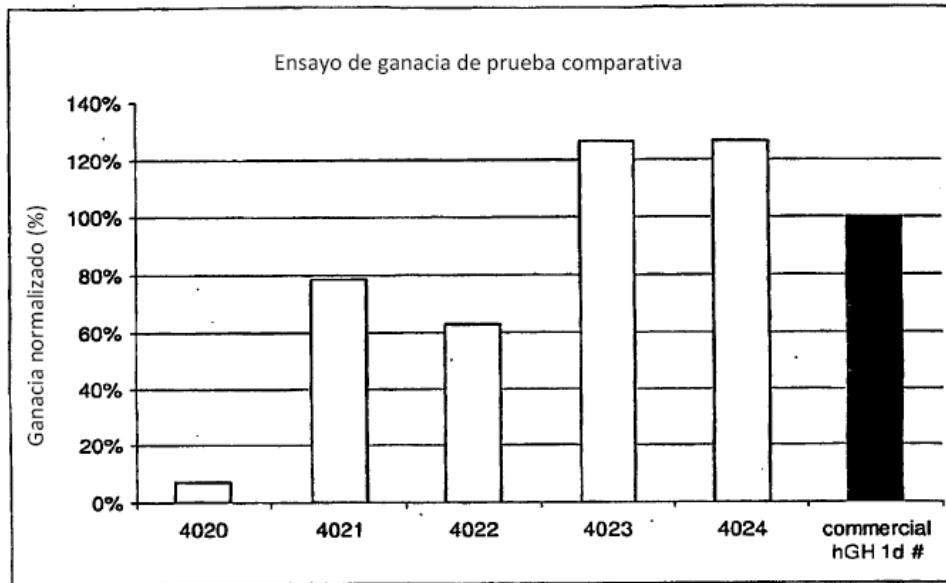


FIGURA 11