

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 966**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2001 E 10075010 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2236152**

54 Título: **Proteínas de fusión de albúmina**

30 Prioridad:

**12.04.2000 US 229358 P**

**25.04.2000 US 199384 P**

**21.12.2000 US 256931**

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

**12.08.2014**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S (100.0%)**

**Krogshøjvej 36**

**2880 Bagsvaerd , DK**

72 Inventor/es:

**BALLANCE, DAVID JAMES y**

**SLEEP, DARRELL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 484 966 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de albúmina

**Antecedentes de la invención**

5 La invención se refiere a proteínas terapéuticas (incluidos, pero sin limitación, un polipéptido, o péptido, o fragmentos y variantes de los mismos) fusionadas con albúmina o fragmentos o variantes de la albúmina, que presentan un periodo de validez prolongado y/o una actividad terapéutica prolongada en disolución. En el presente documento, estas proteínas de fusión se denominan conjuntamente "proteínas de fusión de albúmina de la invención". La invención engloba proteínas de fusión de albúmina terapéuticas, composiciones, composiciones farmacéuticas y formulaciones. En la invención también se engloban moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, células huésped transformadas con ácidos nucleicos y procedimientos de fabricación de las proteínas de fusión de albúmina de la invención usando estos ácidos nucleicos y/o células huésped.

En el presente documento también se divulgan procedimientos de estabilización *in vitro* de una proteína terapéutica por fusión o conjugación de la proteína terapéutica con albúmina o fragmentos o variantes de la albúmina.

15 La seroalbúmina humana (SAH o AH), una proteína de 585 aminoácidos en su forma madura (como se muestra en la figura 2 o en la SEC ID NO: 18), es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como transportador de ligandos endógenos y exógenos. En la actualidad, la AH para uso clínico se produce por extracción de la sangre humana. Se ha divulgado la producción de AH recombinante (AHr) en microorganismos en los documentos EP 330 451 y EP 361 991.

20 El papel de la albúmina como molécula transportadora y su naturaleza inerte son propiedades deseables para su uso como vehículo y transportador de polipéptidos *in vivo*. Se ha sugerido el uso de albúmina como componente de una proteína de fusión de albúmina como transportador para diversas proteínas en los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y EP 413 622. Con el uso de fragmentos N-terminales de HA se puede conseguir la proteína terapéutica por manipulación genética, de tal forma que el ADN que codifica la AH, o un fragmento del mismo, se une al ADN que codifica la proteína terapéutica. Después, se transforma o transfecta un huésped adecuado con las secuencias de nucleótidos fusionadas, dispuestas en un plásmido adecuado de modo que expresen un polipéptido de fusión. La expresión se puede efectuar *in vitro*, por ejemplo, a partir de células procariotas o eucariotas, o *in vivo*, p. ej., a partir de un organismo transgénico.

30 Típicamente, las proteínas terapéuticas en su estado nativo o cuando se producen de forma recombinante, tales como los interferones y las hormonas de crecimiento, son moléculas lábiles que presentan periodos de validez cortos, en particular cuando se formulan en soluciones acuosas. La inestabilidad en estas moléculas cuando se formulan para su administración impone que muchas de las moléculas se deben liofilizar y refrigerar en todo momento durante el almacenamiento, lo que hace que las moléculas sean difíciles de transportar y/o almacenar. Los problemas de almacenamiento son particularmente graves cuando es necesario almacenar y dispensar las formulaciones farmacéuticas fuera del ámbito hospitalario. Muchos fármacos proteínicos y peptídicos también necesitan la adición de concentraciones elevadas de otra proteína, tal como la albúmina, para reducir o evitar la pérdida de proteína debida a la unión al recipiente. Esta es una de las principales preocupaciones con respecto a proteínas tales como el IFN. Por este motivo, muchas proteínas terapéuticas se formulan en combinación con una gran proporción de albúmina como molécula transportadora (exceso de 100-1000 veces), aunque esta es una característica indeseable y cara de la formulación.

Se han propuesto pocas soluciones prácticas para los problemas de almacenamiento de las moléculas de proteína lábiles. En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar formulaciones estabilizadas, de larga duración, de moléculas terapéuticas proteínicas que se dispensen con facilidad, preferentemente con una formulación sencilla que requiera una manipulación posterior al almacenamiento mínima.

**45 Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las proteínas terapéuticas se pueden estabilizar para prolongar su periodo de validez y/o para mantener la actividad de la proteína terapéutica durante periodos de tiempo prolongados en disolución, *in vitro* y/o *in vivo*, al fusionar o conjugar genética o químicamente la proteína terapéutica con albúmina o un fragmento (porción) o variante de la albúmina, que sea suficiente para estabilizar la proteína y/o su actividad. Además, se ha determinado que el uso de proteínas de fusión de albúmina o proteínas conjugadas con albúmina puede reducir la necesidad de formular soluciones de proteínas con grandes excesos de proteínas transportadoras (tales como albúmina, sin fusionar) para evitar la pérdida de proteínas terapéuticas debida a factores tales como la unión al recipiente.

55 El término "una proteína terapéutica" usado en la presente memoria descriptiva se refiere al factor VII. Adicionalmente, el término "albúmina" se refiere a la "albúmina humana". La presente invención engloba proteínas de fusión de albúmina que comprenden una proteína terapéutica (p. ej., un polipéptido o péptido, o fragmentos y variantes de los mismos) fusionada con albúmina o un fragmento (porción) o variante de la albúmina, que es

5 suficiente para prolongar el periodo de validez de la proteína terapéutica y/o estabilizar la proteína terapéutica y/o su actividad en disolución (o en una composición farmacéutica) *in vitro* y/o *in vivo*. En la invención también se engloban moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, células huésped transformadas con estos ácidos nucleicos y procedimientos de preparación de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y de uso de estos ácidos nucleicos y/o células huésped.

10 La invención también engloba formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de albúmina de la invención y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas formulaciones pueden estar en un kit o un recipiente. Este kit o recipiente puede estar empaquetado con instrucciones relativas al periodo de validez prolongado de la proteína terapéutica. Estas formulaciones se pueden usar en procedimientos de tratamiento, prevención, mejora o diagnóstico de una enfermedad o un síntoma de una enfermedad en un paciente, preferentemente un mamífero, lo más preferentemente un ser humano, que comprende la etapa de administrar la formulación farmacéutica al paciente.

15 En otros modos de realización, la presente invención engloba proteínas de fusión de albúmina para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad o trastorno. En modos de realización preferentes, la presente invención engloba proteínas de fusión de albúmina para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno enumerado en la columna de "Indicación preferente Y" de la tabla 1, que comprende administrar a un paciente en el que se desean dichos tratamiento, prevención o mejora, una proteína de fusión de albúmina de la invención que comprende una porción de proteína terapéutica que corresponde a una proteína terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) divulgada en la columna "Proteína terapéutica X" de la tabla 1 (en la misma fila que se divulga la enfermedad o trastorno que se quiere tratar en la columna de "Indicación preferente Y" de la tabla 1) en una cantidad eficaz para tratar, evitar o mejorar la enfermedad o trastorno.

20 También se divulga en el presente documento un procedimiento para prolongar el periodo de validez de una proteína terapéutica (p. ej., un polipéptido o péptido, o fragmentos y variantes de los mismos) que comprende la etapa de fusionar o conjugar la proteína terapéutica con albúmina o un fragmento (porción) o variante de la albúmina, que es suficiente para prolongar el periodo de validez de la proteína terapéutica. La proteína terapéutica usada de acuerdo con este procedimiento se fusiona con la albúmina, o el fragmento o la variante de la albúmina. La proteína terapéutica usada de acuerdo con este procedimiento se fusiona con la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina, por medio de tecnología de ADN recombinante o ingeniería genética.

25 También se divulga en el presente documento un procedimiento para estabilizar una proteína terapéutica (p. ej., un polipéptido o péptido, o fragmentos y variantes de los mismos) en disolución, que comprende la etapa de fusionar o conjugar la proteína terapéutica con albúmina o un fragmento (porción) o variante de la albúmina, que es suficiente para estabilizar la proteína terapéutica.

30 La proteína terapéutica usada de acuerdo con este procedimiento se fusiona con la albúmina, o el fragmento o la variante de la albúmina. La proteína terapéutica usada de acuerdo con este procedimiento se fusiona con la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina, por medio de tecnología de ADN recombinante o ingeniería genética.

35 También se divulgan en el presente documento organismos transgénicos modificados para que contengan las moléculas de ácido nucleico de la invención, preferentemente, modificados para que expresen las proteínas de fusión de albúmina codificadas por las moléculas de ácido nucleico.

40 La presente invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende (i) factor VII, o un fragmento o una variante del factor VII, fusionado con el extremo N-terminal de la (ii) albúmina humana, o un fragmento o una variante de la albúmina humana, en la que el factor VII o un fragmento o una variante del mismo, tiene actividad biológica de factor VII, de tal forma que, en presencia de factor III e iones de calcio, el factor activado convierte el factor IX en factor IXa y/o el factor X en factor Xa y la variante o el fragmento de albúmina puede estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o el periodo de validez del factor VII en comparación con el factor VII sin fusionar, en la que el factor VII o un fragmento o una variante del mismo es la porción N-terminal de la proteína de fusión y la albúmina humana o un fragmento o una variante de la misma es la porción C-terminal de la proteína de fusión.

45 En un modo de realización, el factor VII es factor VII maduro. En otro modo de realización, el factor VII es un mutante por delección N-terminal, un mutante por delección C-terminal o un mutante por delección N-terminal y C-terminal del factor VII. En otro modo de realización, el factor VII se fusiona con la albúmina, o el fragmento o la variante de la albúmina, por medio de un péptido enlazador, preferentemente un enlazador flexible.

50 En un modo de realización, la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina, comprende los residuos de aminoácido de 1 a 585 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 1 a 387 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 1 a 194 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 195 a 387 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 388 a 585 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 195 a 585 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 1 a 194 combinados con los residuos de aminoácido de 388 a 585 de la SEC ID NO: 18.

55 En un modo de realización, la proteína de fusión de albúmina es no glucosilada. En otro modo de realización, la

proteína de fusión tiene una actividad prolongada *in vivo* en comparación con el factor VII cuando no está fusionado con la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina. En otro modo de realización, la proteína de fusión tiene un periodo de validez prologado en comparación con el factor VII cuando no está fusionado con la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina.

- 5 La presente invención también proporciona un medio de cultivo que comprende una proteína de fusión de albúmina de la invención. La invención también proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención y una célula huésped que comprende estos polinucleótidos. En un modo de realización, la célula huésped es una célula de mamífero, tal como una célula COS, CHO (de ovario de hámster chino) o NSO. En otro modo de realización, la célula huésped es una célula de levadura que, opcionalmente, es deficiente en glucosilación y/o deficiente en proteasas y, preferentemente, es *Saccharomyces cerevisiae*. Preferentemente, los codones del polinucleótido están optimizados para su expresión en levadura. En otro modo de realización más, la proteína de fusión se secreta desde la célula huésped.

La presente invención también proporciona un procedimiento para obtener una proteína de fusión de albúmina que comprende cultivar una célula huésped de la invención y purificar la proteína de fusión.

- 15 La presente invención también proporciona una proteína de fusión de albúmina para su uso en tratamientos y composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de albúmina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### Breve descripción de las figuras

- 20 La figura 1 muestra un mapa de un plásmido (pPPC0005) que se puede usar como el vector de base en el que se pueden clonar los polinucleótidos que codifican las proteínas terapéuticas (incluidos polipéptidos y fragmentos y variantes de los mismos) para formar fusiones con la AH. Leyenda del mapa del plásmido: PRB1p: promotor PRB1 de *S. cerevisiae*; FL: secuencia líder de la fusión; AHr: ADNc que codifica la AH; ADH1t: terminador ADH1 de *S. cerevisiae*; T3: sitio de unión de cebador de secuenciación T3; T7: sitio de unión de cebador de secuenciación T7; Amp R: gen de  $\beta$ -lactamasa; ori: origen de replicación. Obsérvese que en las solicitudes provisionales sobre las que la presente solicitud reivindica la prioridad, el plásmido de la figura 1 estaba marcado como pPPC0006, en lugar de pPPC0005. Además, el dibujo de este plásmido no mostraba determinados sitios de restricción pertinente en este vector. Por tanto, en la presente solicitud, el dibujo está marcado como pPPC0005 y se muestran más sitios de restricción del mismo vector.

- 30 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la albúmina humana (SEC ID NO: 18) y un polinucleótido que la codifica (SEC ID NO: 17).

### Descripción detallada

- 35 Como se describe anteriormente, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que proteína terapéutica (p. ej., un polipéptido o péptido, o fragmentos y variantes de los mismos) se puede estabilizar para prolongar el periodo de validez y/o mantener la actividad de la proteína terapéutica durante periodos de tiempo prolongados en disolución (o en una composición farmacéutica) *in vitro* y/o *in vivo*, al fusionar genéticamente la proteína terapéutica, el polipéptido o el péptido con la totalidad o una porción de albúmina suficiente para estabilizar la proteína y su actividad.

- 40 La presente invención se refiere de forma general a proteínas de fusión de albúmina y su uso en el tratamiento, la prevención o la mejorar de enfermedades o trastornos. Tal como se usa en el presente documento, "proteína de fusión de albúmina" se refiere a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o una variante de la misma) con al menos una molécula de proteína terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma). Una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento o una variante de una proteína terapéutica y al menos un fragmento o una variante de seroalbúmina humana, que se asocian entre sí por fusión genética (es decir, la proteína de fusión de albúmina se genera mediante la traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica la totalidad o una porción de una proteína terapéutica está unido en fase con un polinucleótido que codifica la totalidad o parte de la albúmina). La proteína terapéutica y la proteína albúmina, una vez que forman parte de la proteína de fusión de albúmina, se pueden denominar "porción", "región" o "resto" de la proteína de fusión de albúmina (p. ej., una "porción de proteína terapéutica" o una "porción de proteína albúmina").

- 50 En un modo de realización, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende o, de forma alternativa, consiste en, una proteína terapéutica (p. ej., como se describe en la tabla 1) y una proteína de seroalbúmina. En otros modos de realización, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende o, de forma alternativa, que consiste en, un fragmento biológicamente activo y/o terapéuticamente activo de una proteína terapéutica y una proteína de seroalbúmina. En otros modos de realización, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende o, de forma alternativa, que consiste en, una variante biológicamente activa y/o terapéuticamente activa de una proteína terapéutica y una proteína de seroalbúmina. En modos de realización preferentes, el componente de proteína de seroalbúmina de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la seroalbúmina.

En modos de realización preferentes, el componente de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la proteína terapéutica. La porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina puede ser la forma activa de la proteína terapéutica.

5 En otros modos de realización, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende o, de forma alternativa, que consiste en, un fragmento o una variante biológicamente activos y/o terapéuticamente activos de una proteína terapéutica y un fragmento o una variante biológicamente activos y/o terapéuticamente activos de una proteína de seroalbúmina. En modos de realización preferentes, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende o, de forma alternativa, que consiste en, la porción madura de una proteína terapéutica y la porción madura de la seroalbúmina.

## 10 **Proteínas terapéuticas**

Como se indica anteriormente, una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento o una variante de una proteína terapéutica y al menos un fragmento o una variante de la seroalbúmina humana, que se asocian entre sí por fusión genética.

15 Tal como se usa en el presente documento, "proteína terapéutica" se refiere a proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos o variantes de los mismos, que tienen una o más actividades terapéuticas y/o biológicas. Las proteínas terapéuticas que engloba la invención son proteínas de factor VII. (En el presente documento, se usan indistintamente los términos péptidos, proteínas y polipéptidos). Por tanto, una proteína de fusión de albúmina de la invención puede contener al menos un fragmento o una variante de una proteína terapéutica. Adicionalmente, el término "proteína terapéutica" puede referirse al correlato endógeno o natural de una proteína terapéutica.

20 Con un polipéptido que presenta una "actividad terapéutica" o una proteína que es "terapéuticamente activa" se quiere decir un polipéptido que posee una o más actividades biológicas y/o terapéuticas conocidas asociadas con una proteína terapéutica tal como una o más de las proteínas terapéuticas descritas en el presente documento o que se conocen de otro modo en la técnica.

25 El ensayo para las proteínas terapéuticas (cuando están en forma activa) es el ensayo de coagulación con el uso del tiempo de coagulación de la protrombina: Belaouaj et al., J. Biol. Chem. 275:27123-8(2000); Diaz-Collier et al., Thromb Haemost 71:339-46 (1994), como se muestra en la tabla 1 en la columna de "Ensayo de actividad ejemplar".

30 Con frecuencia, las proteínas terapéuticas que corresponden a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención se modifican por la unión de uno o más grupos oligosacáridos. La modificación, denominada glucosilación, puede afectar de forma espectacular a las propiedades físicas de las proteínas y puede ser importante en la estabilidad, la secreción y la ubicación de las proteínas. La glucosilación se produce en ubicaciones específicas a lo largo del esqueleto polipeptídico. Normalmente, hay dos tipos principales de glucosilación: la glucosilación caracterizada por oligosacáridos O-enlazados, que se unen a residuos de serina o treonina; y la glucosilación caracterizada por oligosacáridos N-enlazados, que se unen a residuos de asparagina en una secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. El ácido N-acetilneuramínico (conocido también como ácido siálico) suele ser el residuo terminal tanto de los oligosacáridos N-enlazados como de los O-enlazados. Las variables tales como la estructura de la proteína y el tipo de célula influyen en el número y la naturaleza de las unidades de hidratos de carbono dentro de las cadenas en diferentes sitios de glucosilación. También son comunes en el mismo sitio, dentro de un tipo de célula dado, los isómeros de glucosilación.

40 La proteínas terapéuticas que corresponden a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, así como los análogos y las variantes de las mismas, se pueden modificar de modo que se altere la glucosilación en uno o más sitios como consecuencia de la(s) manipulación/manipulaciones de su secuencia de ácidos nucleicos, por la célula huésped en la que se expresan o debido a otras condiciones de su expresión. Por ejemplo, se pueden producir isómeros de glucosilación al suprimir o introducir sitios de glucosilación, p. ej., por sustitución o delección de residuos de aminoácido, tal como por sustitución de glutamina por asparagina, o se pueden producir proteínas recombinantes no glucosiladas al expresar las proteínas en células huésped que no las glucosilarán, p. ej., en *E. coli* o levaduras deficientes en glucosilación. Estos planteamientos se describen con mayor detalle a continuación y son conocidos en la técnica.

50 La tabla 1 proporciona una lista que no es exhaustiva de proteínas terapéuticas que corresponden a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención. La columna de "Proteína terapéutica X" divulga moléculas de proteína terapéutica seguidas por paréntesis que contienen nombres científicos y comerciales que comprenden o, de forma alternativa, que consisten en, esa molécula de proteína terapéutica o un fragmento o una variante de la misma. Tal como se usa en el presente documento "proteína terapéutica X" puede referirse a una molécula de proteína terapéutica individual (definida por la secuencia de aminoácidos que se puede obtener de los  
55 número de acceso del CAS y de Genbank) o al grupo entero de proteínas terapéuticas asociadas con una molécula de proteína terapéutica dada divulgada en esta columna. La columna de "Identificador ejemplar" proporciona números de registro del Chemical Abstracts Services (CAS) (publicado por la American Chemical Society) y/o números de acceso de Genbank (p. ej., ID de locus, NP\_XXXXX (proteína con secuencia de referencia)) e

5 identificadores XP\_XXXXX (proteína modelo) disponibles a través de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) que corresponden a entradas del registro del CAS o de la base de datos de Genbank que contienen una secuencia de aminoácidos de la molécula de proteína terapéutica o de un fragmento o una variante de la molécula de proteína terapéutica. La columna de "Referencia PCT/de patente" proporciona números de patentes de EE. UU. o números de publicaciones internacionales PCT que corresponden a patentes y/o solicitudes de patente publicadas que describen la molécula de proteína terapéutica. La columna de "Actividad biológica" describe las actividades biológicas asociadas con la molécula de proteína terapéutica. La columna de "Ensayo de actividad ejemplar" proporciona referencias que describen ensayos que se pueden usar para probar la actividad terapéutica y/o biológica de una proteína terapéutica o una proteína de fusión de albúmina de la invención que comprende una porción de una proteína terapéutica X. La columna de "Indicación preferente Y" describe enfermedades, trastornos y/o afecciones que se pueden tratar, evitar, diagnosticar o mejorar con la proteína terapéutica X o una proteína de fusión de albúmina de la invención que comprende una porción de una proteína terapéutica X.

Proteína terapéutica X	Identificador ejemplar	Referencia PCT/de patente	Actividad biológica	Ensayo de actividad ejemplar	Indicación preferente Y
Factor VII (factor de coagulación VII, Eptacog alfa, factor de coagulación VIIa, Novoseven, NiaStase, Novostase);	CAS-102786-61-8 ID de locus:2155 NP_000122 NP_062562 XP_007179 XP_007180	Documento US5580560-A  Documento EP200421-A Documento WO9309804-A	El factor de coagulación VII es un factor dependiente de la vitamina K esencial para la hemostasia. Este factor circula en la sangre en forma de zimógeno y se convierte en una forma activa por el factor IXa, el factor Xa, el factor XIIa o la trombina, mediante proteólisis menor. Después de la activación del factor VII, se generan una cadena pesada que contiene un dominio catalítico y una cadena ligera que contiene dos dominios de tipo EGF, y las dos cadenas se mantienen unidas por un puente disulfuro. En presencia del factor III e iones de calcio, el factor activado activa a continuación la cascada de coagulación al convertir el factor IX en el factor IXa y/o el factor X en el factor Xa. Los defectos en este gen pueden provocar coagulopatías.	Ensayo de coagulación usando el tiempo de coagulación de la protrombina (Belaaouaj AA et al., J. Biol. Chem. a 275: 27123-8, 2000; Diaz-Collier JA et al., Thromb Haemost 71: 339-46; 1994).	Trastornos hemorrágicos, hemofilia A y B, trastornos hepáticos, episodios hemorrágicos relacionados con intervenciones quirúrgicas

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden realizar una actividad terapéutica y/o una actividad biológica correspondiente a la actividad terapéutica y/o la actividad biológica de la proteína terapéutica correspondiente a la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina enumerada en la fila correspondiente de la tabla 1. (Véanse, p. ej., las columnas de "Actividad biológica" y "Proteína terapéutica X" de la tabla 1.) En otros modos de realización preferentes, las porciones de proteína terapéuticamente activas de las proteínas de fusión de albúmina de la invención son fragmentos o variantes de la secuencia de referencia mencionada en la columna de "Identificador ejemplar" de la tabla 1 y pueden realizar la actividad terapéutica y/o biológica de la proteína terapéutica correspondiente divulgada en la columna "Actividad biológica" de la tabla 1.

### **Fragmentos y variantes de polipéptidos y polinucleótidos**

#### **10 Fragmentos**

La presente invención se refiere además a fragmentos de las proteínas terapéuticas descritas en la tabla 1, proteínas de albúmina y/o proteínas de fusión de albúmina de la invención.

En consecuencia, los fragmentos de una proteína terapéutica que corresponden a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, incluyen la proteína de longitud completa, así como polipéptidos que tengan uno o más residuos delecionados del extremo amino de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia (p. ej., una proteína terapéutica como se divulga en la tabla 1). La invención también engloba los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Además, los fragmentos de polipéptidos de seroalbúmina que corresponden a una porción de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, incluyen la proteína de longitud completa, así como polipéptidos que tengan uno o más residuos delecionados del extremo amino de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia (p. ej., seroalbúmina). En particular, las deleciones N-terminales se pueden describir mediante la fórmula general  $m - 585$ , donde 585 es un número entero natural que representa el número total de residuos de aminoácido de la seroalbúmina (SEC ID NO: 18) y  $m$  se define como cualquier número entero desde 2 hasta 579. La invención también engloba los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Además, los fragmentos de proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen la proteína de fusión de albúmina de longitud completa, así como polipéptidos que tienen uno o más residuos delecionados del extremo amino de la proteína de fusión de albúmina. La invención también engloba los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Se puede determinar si un polipéptido en particular que carece de los residuos N-terminales y/o C-terminales de un polipéptido de referencia mantiene la actividad terapéutica o no por procedimientos rutinarios descritos en el presente documento y/o de otros modos conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona además polipéptidos que tienen uno o más residuos delecionados del extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos de una proteína terapéutica que corresponde a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., una proteína terapéutica a la que se hace referencia en la tabla 1). La invención también engloba los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Además, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen uno o más residuos delecionados del extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos de una proteína albúmina que corresponde a una porción de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., seroalbúmina). En particular, las deleciones C-terminales se pueden describir con la fórmula general  $1 - n$ , donde  $n$  es cualquier número entero natural en el intervalo de 6 a 584, donde 584 es el número entero natural que representa el número total de residuos de aminoácido de la seroalbúmina (SEC ID NO: 18) menos 1. La invención también engloba los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Además, se puede combinar cualquiera de las deleciones N- o C-terminales descritas anteriormente para producir un polipéptido de referencia delecionado en el extremo N- y C-terminal. La invención también proporciona polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos delecionados de los extremos tanto amino como carboxilo, que se pueden describir de forma general como polipéptidos que tienen  $m - n$  residuos de un polipéptido de referencia (p. ej., una proteína terapéutica a la que se hace referencia en la tabla 1, o seroalbúmina (p. ej., la SEC ID NO: 18), o una proteína de fusión de albúmina de la invención) donde  $n$  y  $m$  son números enteros como se describe anteriormente. La invención también engloba los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Los fragmentos de polipéptido de la invención son fragmentos que comprenden o, de forma alternativa, que consisten en, una secuencia de aminoácidos que presenta una actividad terapéutica y/o una actividad funcional (p. ej. una actividad biológica) de la secuencia polipeptídica de la proteína terapéutica o proteína de seroalbúmina de la que la secuencia de aminoácidos es un fragmento.

#### **Variantes**

"Variante" se refiere a un polinucleótido o un ácido nucleico que difiere de un ácido nucleico o polipéptido de

referencia, pero que mantiene las propiedades esenciales del mismo. En general, las variantes en su conjunto son muy similares y, en muchas regiones, idénticas al ácido nucleico o el polipéptido de referencia.

Tal como se usa en el presente documento, "variante", se refiere a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, una porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, o una proteína de fusión de albúmina que difiere en cuanto a la secuencia de una proteína terapéutica (p. ej., véase la columna de "terapéutica" de la tabla 1), una proteína albúmina y/o una proteína de fusión de albúmina de la invención, respectivamente, pero que mantiene al menos una propiedad funcional y/o terapéutica de las mismas (p. ej., una actividad terapéutica y/o una actividad biológica como se divulga en la columna de "Actividad biológica" de la tabla 1) como se describe en otros puntos del presente documento o se conoce de otro modo en la técnica. En general, las variantes en su conjunto son muy similares y, en muchas regiones, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la proteína terapéutica que corresponde a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, una proteína albúmina que corresponde a una porción de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o una proteína de fusión de albúmina de la invención. La invención también engloba los ácidos nucleicos que codifican estas variantes.

Las presente invención también se refiere a proteínas que comprenden o, de forma alternativa, consisten en, una secuencia de aminoácidos que es al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idéntica, por ejemplo, a la secuencia de aminoácidos de una proteína terapéutica que corresponde a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., una secuencia de aminoácidos divulgada en la columna de "Identificador ejemplar" de la tabla 1, o fragmentos o variantes de la misma), proteínas albúmina (p. ej., la SEC ID NO: 18 o fragmentos o variantes de la misma) que corresponden a una porción de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, y/o proteínas de fusión de albúmina de la invención. También se proporcionan fragmentos de estos polipéptidos (p. ej., los fragmentos descritos en el presente documento). Otros polipéptidos que engloba la invención son los polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con el complemento de una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de la invención en condiciones de hibridación rigurosas (p. ej., hibridación con ADN unido a un filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6x aproximadamente a 45 grados centígrados, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2x, SDS al 0,1 % aproximadamente a 50 - 65 grados centígrados), en condiciones de hibridación muy rigurosas (p. ej., hibridación con ADN unido a un filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6x aproximadamente a 45 grados centígrados, seguida de uno o más lavados en SSC 0,1x, SDS al 0,2 % aproximadamente a 68 grados centígrados) o en otras condiciones de hibridación rigurosas conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989 Current protocol in Molecular Biology, Green publishing associates, Inc., y John Wiley & Sons Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1 - 6.3.6 y 2.10.3). La invención también engloba los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Con un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos "idéntica", por ejemplo, en al menos el 95 % a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente invención, se pretende indicar que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia de consulta excepto en que la secuencia polipeptídica objeto puede incluir hasta cinco modificaciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de consulta, se puede insertar, deletar o sustituir por otro aminoácido hasta el 5 % de los residuos de aminoácido de la secuencia objeto. Estas modificaciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones amino- o carboxilterminal de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, se puede determinar de forma convencional si un polipéptido en particular es o no idéntico en al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %, por ejemplo, a la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de albúmina de la invención o a un fragmento de la misma (tal como la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina o la porción de albúmina de la proteína de fusión de albúmina), usando un programa de ordenador conocido. Un procedimiento preferente para determinar la mejor coincidencia general entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominada alineación de secuencias global, se puede determinar usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci.6:237-245 (1990)). En una alineación de secuencias, la secuencia de consulta y la objeto son ambas secuencias de nucleótidos o son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación de secuencias global se expresa como porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes usados en una alineación de aminoácidos con FASTDB son: matriz = PAM 0, k-tuple = 2, penalización de no coincidencia = 1, penalización por unión = 20, longitud de grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, tamaño de ventana = longitud de secuencia, penalización por hueco = 5, penalización por tamaño de hueco = 0,05, tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, la que se más corta.

la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta por delecciones N- o C-terminales, no debido a delecciones internas, es necesario realizar una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos N- y C-terminales de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para secuencias objeto truncadas en los extremos N- y C-terminales, con relación a la



secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia de consulta que son N- y C-terminales de la secuencia objeto que no coinciden/se alinean con un residuo objeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Si un residuo coincide/está alineado o no se determina mediante los resultados de la alineación de secuencias con FASTDB. Este porcentaje se resta después del porcentaje de identidad, calculado con el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es lo que se usa para los fines de la presente invención. Para los fines de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad, solamente se consideran los residuos de los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto que no coinciden/están alineados con la secuencia de consulta. Es decir, solamente los residuos de consulta en posiciones fuera de los residuos más N- y C-terminales de la secuencia objeto.

Por ejemplo, se alinea una secuencia objeto de 90 residuos de aminoácido con una secuencia de consulta de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La delección se produce en el extremo N-terminal de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación con FASTDB no muestra una coincidencia/alineación de los primeros 10 residuos del extremo N-terminal. Los 10 residuos sin aparear representan el 10 % de la secuencia (número de residuos en los extremos N- y C-terminales no coincidentes/número total de residuos de la secuencia de consulta), por lo que se resta el 10 % de la puntuación de porcentaje de identidad calculada con el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes coincidieran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 residuos con una secuencia de consulta de 100 residuos. Esta vez las delecciones son delecciones internas, por lo que no hay residuos en los extremos N- o C-terminales de la secuencia objeto que no coincidan/estén alineados con la de consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado con FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, únicamente se corrigen manualmente los residuos que en la alineación con FASTDB se muestran en posiciones fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto, que no coinciden/están alineados con la secuencia de consulta. Para los propósitos de la presente invención no se realizará ninguna otra corrección manual.

La variante tendrá una identidad de secuencia de al menos el 75 % (preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, el 90 %, el 95 % o el 99 %) con una longitud de AH o proteína terapéutica normal que tenga la misma longitud que la variante. La homología o identidad en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos se determina por un análisis con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) usando el algoritmo empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx (Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990) y Altschul, J. Mol. Evol. 36: 290-300 (1993)) que están adaptados para la búsqueda de similitudes de secuencia.

El enfoque que usa el programa BLAST es considerar en primer lugar segmentos similares entre una secuencia de consulta y una secuencia de la base de datos, evaluar después la significación estadística de todas las coincidencias que se identifican y, por último, resumir únicamente aquellas coincidencias que satisfacen un umbral de significación preseleccionado. Para un análisis de los aspectos básicos de la búsqueda de similitud en secuencias de bases de datos, véase Altschul et al., (Nature Genetics 6: 119-129 (1994)). Los parámetros de búsqueda para histograma, descripciones, alineaciones, suposiciones (es decir, el umbral de significación estadística para registrar coincidencias contra las secuencias de la base de datos), corte, matriz y filtro se encuentran en la configuración por defecto. La matriz de puntuación por defecto que usan blastp, blastx, tblastn y tblastx es la matriz BLOSUM62 (Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 (1992)). Para blastn, la matriz de puntuación se fija con la relación de M (es decir, la puntuación de recompensa por un par de residuos coincidentes) y N (es decir, la puntuación de penalización por residuos no coincidentes), en la que los valores por defecto de M y N son 5 y -4, respectivamente. Se pueden ajustar cuatro parámetros de blastn como sigue: Q = 10 (penalización por creación de hueco); R = 10 (penalización por extensión de hueco); wink = 1 (genera coincidencias de palabra en cada wink<sup>a</sup> posición a lo largo de la consulta); y gapw = 16 (fija la anchura de la ventana dentro de la cual se generan alineaciones con huecos). Las configuraciones de parámetros equivalentes en Blastp fueron Q = 9, R = 2, wink = 1 y gapw = 32. Una comparación Bestfit entre secuencias, disponible en el paquete GCG, versión 10.0, usa los parámetros de ADN GAP = 50 (penalización por creación de hueco) y LEN = 3 (penalización por extensión de hueco) y las configuraciones equivalentes para la comparación de proteínas son GAP = 8 y LEN = 2.

Las variantes de polinucleótidos de la invención pueden contener modificaciones en las regiones codificantes, las regiones no codificantes o ambas. Son especialmente preferentes las variantes de polinucleótidos que contienen modificaciones que producen sustituciones, adiciones o delecciones silenciosas, pero que no modifican las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Son preferentes las variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debidas a la degeneración del código genético. Además, también son preferentes las variantes de polipéptidos en las que se sustituyen, delecionan o se añaden en cualquier combinación menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, o 5-50, 5-25, 5-10, 1-5, o 1-2 aminoácidos. Se pueden producir variantes de polinucleótidos por una variedad de motivos, p. ej., para optimizar la expresión de los codones para un huésped en particular (cambio de codones del ARNm humano por los preferentes en un huésped bacteriano, tal como una levadura o *E. coli*).

En un modo de realización preferente, se optimiza un polinucleótido que codifica una porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención para su expresión en células de levadura o de mamífero. En otro modo de realización preferente, se optimiza un polinucleótido que codifica una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención para su expresión en células de levadura o de mamífero. En otro

modo de realización preferente más, se optimiza un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención para su expresión en células de levadura o de mamífero.

En un modo de realización alternativo, un polinucleótido de codones optimizados que codifica una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención no hibrida con el polinucleótido natural que codifica la proteína terapéutica en condiciones de hibridación rigurosas como se describe en el presente documento. En otro modo de realización, un polinucleótido de codones optimizados que codifica una porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención no hibrida con el polinucleótido natural que codifica la proteína albúmina en condiciones de hibridación rigurosas como se describe en el presente documento. En otro modo de realización, un polinucleótido de codones optimizados que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención no hibrida con el polinucleótido natural que codifica la porción de proteína terapéutica o la porción de proteína albúmina en condiciones de hibridación rigurosas como se describe en el presente documento.

En otro modo de realización, los polinucleótidos que codifican una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención no comprenden o, de forma alternativa, no consisten en, la secuencia natural de esa proteína terapéutica. En otro modo de realización, los polinucleótidos que codifican una porción de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención no comprenden o, de forma alternativa, no consisten en, la secuencia natural de la proteína albúmina. En un modo de realización alternativo, los polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención no comprenden o, de forma alternativa, no consisten en, la secuencia natural de una porción de proteína terapéutica o la porción de proteína albúmina.

Las variantes naturales se denominan "variantes alélicas" y se refieren a una o varias formas alternativas en que un gen ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar con respecto al polinucleótido y/o el polipéptido y se incluyen en la presente invención. De forma alternativa, se pueden producir variantes no naturales por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

Usando procedimientos conocidos de genomanipulación de proteínas y tecnología de ADN recombinante, se pueden generar variantes para mejorar o modificar las características de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, se pueden delecionar uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido de la presente invención sin una pérdida sustancial de función biológica. Como ejemplo, Ron et al. (J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993)) informaron de proteínas variantes KGF con actividad de unión a la heparina incluso después de delecionar 3, 8 o 27 residuos de aminoácido aminoterminales. De forma similar, el interferón gamma presentaba una actividad hasta diez veces mayor después de delecionar 8-10 residuos de aminoácido del extremo carboxilo de esta proteína. (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988).)

Además, numerosas pruebas demuestran que, con frecuencia, las variantes mantienen una actividad biológica similar a la de la proteína natural. Por ejemplo, Gayle y sus colaboradores (J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993)) llevaron a cabo extensos análisis mutacionales de la citocina IL-1a humana. Usaron mutagénesis aleatoria para generar más de 3.500 mutantes individuales de IL-1a con un promedio de 2,5 cambios de aminoácidos por variante en la longitud completa de la molécula. Se estudiaron varias mutaciones en cada posición de aminoácido posible. Los investigadores descubrieron que "se podía modificar la mayor parte de la molécula con poco efecto sobre la actividad biológica o la de unión". De hecho, solamente 23 secuencias de aminoácidos exclusivas, de las más de 3.500 secuencias de nucleótidos estudiadas, producían una proteína que difería significativamente en la actividad de la natural, descrita en el presente documento y conocida de otro modo en la técnica.

Por tanto, la invención incluye variantes de polipéptidos que tienen una actividad funcional (p. ej., actividad biológica y/o actividad terapéutica). La invención proporciona variantes de proteínas de fusión de albúmina que tienen una actividad funcional (p. ej., una actividad biológica y/o actividad terapéutica, tal como las divulgadas en la columna de "Actividad biológica" de la tabla 1) que corresponde a una o más actividades biológicas y/o terapéuticas de la proteína terapéutica que corresponden a la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina. Estas variantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de acuerdo con las normas generales conocidas en la técnica para que tengan poco efecto sobre la actividad.

En modos de realización preferentes, las variantes de la invención tienen sustituciones conservadoras. Con "sustituciones conservadoras" se pretende indicar intercambios dentro de grupos tales como el reemplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; el reemplazo de los residuos de hidroxilo Ser y Thr; el reemplazo de los residuos ácidos Asp y Glu; el reemplazo de los residuos de amida Asn y Gln; el reemplazo de los residuos básicos Lys, Arg e His; el reemplazo de los residuos aromáticos Phe, Tyr y Trp; y el reemplazo de los aminoácidos de tamaño pequeño Ala, Ser, Thr, Met y Gly.

Se proporcionan directrices relativas a cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas, por ejemplo, en Bowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", Science 247:1306-1310 (1990), donde los autores indican que existen dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

La primera estrategia aprovecha la tolerancia de las sustituciones de aminoácidos por selección natural durante el

proceso de evolución. Al comparar secuencias de aminoácidos de diferentes especies, se pueden identificar aminoácidos conservados. Probablemente, estos aminoácidos conservados son importantes para la función de la proteína. En contraste, las posiciones de aminoácido donde la selección natural ha tolerado sustituciones indican que estas posiciones no son esenciales para la función de la proteína. Por tanto, las posiciones que toleran la sustitución de aminoácidos se podrían modificar, manteniendo aun así la actividad biológica de la proteína.

La segunda estrategia usa la ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones esenciales para la función de la proteína. Por ejemplo, se pueden usar mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis de barrido de alanina (introducción de mutaciones de alanina individuales en todos los residuos de la molécula). Véase Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989). Las moléculas mutantes resultantes se pueden probar después para determinar su actividad biológica.

Como afirman los autores, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además qué cambios de aminoácidos es más probable que se permitan en determinadas posiciones de aminoácido de la proteína. Por ejemplo, los residuos de aminoácido más enterrados (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que, en general, se conservan pocas características de las cadenas laterales de superficie. Además, las sustituciones de aminoácidos conservadoras toleradas implican el reemplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; el reemplazo de los residuos de hidroxilo Ser y Thr; el reemplazo de los residuos ácidos Asp y Glu; el reemplazo de los residuos de amida Asn y Gln; el reemplazo de los residuos básicos Lys, Arg e His; el reemplazo de los residuos aromáticos Phe, Tyr y Trp; y el reemplazo de los aminoácidos de tamaño pequeño Ala, Ser, Thr, Met y Gly. Además, de la sustitución de aminoácidos conservadora, las variantes de la presente invención incluyen (i) polipéptidos que contienen sustituciones de uno o más de los residuos de aminoácido no conservados, donde los residuos de aminoácido sustituidos pueden estar codificados o no por el código genético, o (ii) polipéptidos que contienen sustituciones de uno o más de los residuos de aminoácido que tienen un grupo sustituyente, o (iii) polipéptidos que se han fusionado o conjugado químicamente con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la estabilidad y/o la solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), (iv) polipéptidos que contienen aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, un péptido de fusión de la región Fc de IgG. Se considera que estos polipéptidos variantes se encuentran dentro del alcance de los expertos en la técnica de las enseñanzas del presente documento.

Por ejemplo, los polipéptidos variantes que contienen sustituciones de aminoácidos de aminoácidos cargados por otros aminoácidos cargados o neutros pueden producir proteínas con características mejoradas, tales como menos agregación. La agregación de las formulaciones farmacéuticas reduce la actividad y aumenta el aclaramiento debido a la actividad inmunógena del agregado. Véanse Pinckard et al., *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340 (1967); Robbins et al., *Diabetes* 36: 838-845 (1987); Cleland et al., *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377 (1993).

En modos de realización específicos, los polipéptidos de la invención comprenden o, de forma alternativa, consisten en, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína terapéutica descrita en el presente documento y/o de la seroalbúmina humana y/o de una proteína de fusión de albúmina de la invención, en los que los fragmentos o las variantes tienen 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 o 50-150, adiciones, sustituciones y/o deleciones de residuos de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia. En modos de realización preferentes, las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. La invención también engloba los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos.

El polipéptido de la presente invención se puede modificar bien mediante procesos naturales, tales como el procesamiento postraducciona, o bien por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Las modificaciones de este tipo están bien descritas en manuales básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación. Las modificaciones se pueden producir en cualquier lugar de un polipéptido, incluidos el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxiloterminales. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o en distinto grado en varios sitios de un polipéptido dado. Asimismo, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados, por ejemplo, como consecuencia de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser consecuencia de los procesos naturales postraduccionales o se pueden preparar por procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o un derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o un derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación, mediada por ARN transferente y ubiquitinación. (Véanse, por ejemplo, *PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990); Rattan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)).

**Actividad funcional**

"Un polipéptido que tiene actividad funcional" se refiere a un polipéptido que tiene la actividad definida en la reivindicación 1.

5 "Un polipéptido que tiene actividad biológica" se refiere a un polipéptido que presenta una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de una proteína terapéutica de la presente invención, incluidas las formas maduras, medida en un ensayo biológico en particular, con o sin dependencia de la dosis. En caso de que exista dependencia de la dosis, no es necesariamente idéntica a la del polipéptido, sino sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con el polipéptido de la presente invención (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad y lo más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad con relación al polipéptido de la presente invención).

La proteína de fusión de albúmina de la invención tiene al menos una actividad biológica y/o terapéutica asociada con la proteína terapéutica (o fragmento o variante de la misma) cuando no está fusionada con la albúmina.

15 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden someter a ensayo para determinar su actividad funcional (p. ej., su actividad biológica) usando o modificando de forma rutinaria ensayos conocidos en la técnica, así como ensayos descritos en el presente documento. De forma específica, las proteínas de fusión de albúmina se pueden someter a ensayo para determinar su actividad funcional (p. ej., su actividad biológica) usando el ensayo al que se hace referencia en la columna de "Ensayo de actividad ejemplar" de la tabla 1. Adicionalmente, un experto en la técnica puede someter a ensayo de forma rutinaria fragmentos de una proteína terapéutica que corresponden a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, para determinar su actividad usando ensayos a los que se hace referencia en su fila correspondiente de la tabla 1. Además, un experto en la técnica puede someter a ensayo de forma rutinaria fragmentos de una proteína albúmina que corresponden a una porción de proteína albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención, para determinar su actividad usando ensayos conocidos en la técnica y/o descritos en la sección de ejemplos, más adelante.

25 Además, se pueden aplicar de forma rutinaria ensayos descritos en el presente documento (véanse los ejemplos y la tabla 1) y conocidos de otro modo en la técnica para medir la capacidad de las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención y los fragmentos, las variantes y los derivados de las mismas, para provocar una actividad biológica y/o una actividad terapéutica (bien *in vitro* o bien *in vivo*) relacionada con la porción de proteína terapéutica y/o con la porción de albúmina de la proteína de fusión de albúmina de la presente invención. El experto en la técnica conocerá otros procedimientos y se encuentran dentro del alcance de la invención.

**Albúmina**

Como se describe anteriormente, una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento o una variante de una proteína terapéutica y al menos un fragmento o una variante de la seroalbúmina humana, que se asocian entre sí por fusión genética.

35 En el presente documento, se usan indistintamente los términos seroalbúmina humana (SAH) y albúmina humana (AH).

40 Tal como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere de forma colectiva a la proteína albúmina o la secuencia de aminoácidos, o a un fragmento o una variante de la albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas) de la albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a la albúmina humana o fragmentos de la misma (véanse los documentos EP 201239, EP 322 094, WO 97/24445, WO95/23857), especialmente la forma madura de la albúmina humana como se muestra en la figura 2 (SEC ID NO: 18), o a la albúmina de otros vertebrados o fragmentos de la misma, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de las mismas.

45 En modos de realización preferentes, la proteína seroalbúmina humana usada en las proteínas de fusión de albúmina de la invención contiene uno o los ambos de los siguientes juegos de mutaciones puntuales con referencia a la SEC ID NO: 18: Leu-407 a Ala, Leu-408 a Val, Val-409 a Ala y Arg-410 a Ala; o Arg-410 a A, Lys-413 a Gln y Lys-414 a Gln (véase, p. ej., la publicación internacional n.º WO95/23857). En modos de realización aún más preferentes, las proteínas de fusión de albúmina de la invención que contienen uno o ambos de los juegos de mutaciones puntuales descritos anteriormente tienen una estabilidad/resistencia mejorada a la escisión proteolítica por la levadura Yap3p, lo que permite el aumento de la producción de proteínas de fusión de albúmina recombinantes expresadas en células huésped de levadura.

55 Tal como se usa en el presente documento, una porción de albúmina suficiente para prolongar la actividad terapéutica o el periodo de validez de la proteína terapéutica se refiere a una porción de albúmina de longitud o estructura suficientes para estabilizar o prolongar la actividad terapéutica de la proteína, de modo que el periodo de validez de la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina se prolonga o extiende en comparación con el periodo de validez en el estado no fusionado. La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina puede comprender la longitud completa de la secuencia de la AH como se describe anteriormente o

como se muestra en la figura 2, o puede incluir uno o más fragmentos de la misma que puedan estabilizar o prolongar la actividad terapéutica. Estos fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir aproximadamente 15, 20, 25, 30, 50 o más aminoácidos contiguos de la secuencia de la AH o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios específicos de la AH. Por ejemplo, se pueden usar uno o más fragmentos de la AH que abarquen los dos primeros dominios de tipo inmunoglobulina.

La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina de la invención puede ser una variante de la AH normal. La porción de proteína terapéutica de las proteínas de fusión de albúmina de la invención también puede ser una variante de las proteínas terapéuticas descritas en el presente documento. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, donde tales cambios no modifican sustancialmente una o más de las propiedades oncóticas, de unión de ligandos útiles y no inmunógenas de la albúmina, o el sitio activo, o el dominio activo que confiere las actividades terapéuticas de las proteínas terapéuticas.

En particular, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden incluir variantes polimorfas naturales de la albúmina humana y fragmentos de la albúmina humana, por ejemplo, los fragmentos divulgados en el documento EP 322 094 (a saber, AH (Pn), donde n es de 369 a 419).

En términos generales, un fragmento o una variante de la AH tendrá al menos 100 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 150 aminoácidos de longitud. La variante de la AH puede consistir en o, de forma alternativa, comprender, al menos un dominio completo de la AH, por ejemplo, los dominios 1 (aminoácidos 1-194 de la SEC ID NO: 18), 2 (aminoácidos 195-387 de la SEC ID NO: 18), 3 (aminoácidos 388-585 de la SEC ID NO: 18), 1 + 2 (1-387 de la SEC ID NO: 18), 2 + 3 (195-585 de la SEC ID NO: 18) o 1 + 3 (aminoácidos 1-194 de la SEC ID NO: 18 + aminoácidos 388-585 de la SEC ID NO: 18). Cada dominio está formado por dos subdominios homólogos, a saber 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras inter subdominios que comprenden los residuos Lys106 a Glu119, Glu292 a Va1315 y Glu492 a Ala511.

Preferentemente, la porción de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un subdominio o dominio de la AH o modificaciones conservadoras de la misma. Si la fusión se basa en subdominios, preferentemente, parte o la totalidad del enlazador adyacente se usa para enlazar el resto de proteína terapéutica.

### **Proteínas de fusión de albúmina**

La presente invención se refiere de forma general a proteínas de fusión de albúmina y su uso en el tratamiento, la prevención o la mejorar de enfermedades o trastornos. Tal como se usa en el presente documento, "proteína de fusión de albúmina" se refiere a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de albúmina (o un fragmento o una variante de la misma) con al menos una molécula de proteína terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma). Una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos un fragmento o una variante de una proteína terapéutica y al menos un fragmento o una variante de seroalbúmina humana, que se asocian entre sí por fusión genética (es decir, la proteína de fusión de albúmina se genera mediante la traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica la totalidad o una porción de una proteína terapéutica está unido en fase con un polinucleótido que codifica la totalidad o parte de la albúmina). La proteína terapéutica y la proteína albúmina, una vez que forman parte de la proteína de fusión de albúmina, se pueden denominar "porción", "región" o "resto" de la proteína de fusión de albúmina.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden la AH como la porción C-terminal y una proteína terapéutica como la porción N-terminal.

Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden incluir un péptido enlazador entre las porciones fusionadas para proporcionar una mayor separación física entre los restos y, por tanto, aumentar al máximo la accesibilidad de la porción de proteína terapéutica, por ejemplo, para unirse a su receptor afín. El péptido enlazador puede consistir en aminoácidos tales que sea flexible o más rígido.

Por lo tanto, como se describe anteriormente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden tener la siguiente fórmula R1-L-R2; en la que R1 es la proteína terapéutica, el péptido o la secuencia polipeptídica, L es un enlazador y R2 es una secuencia de seroalbúmina.

En modos de realización preferentes, las proteínas de fusión de albúmina de la invención que comprenden una proteína terapéutica tienen un periodo de validez prolongado en comparación con el periodo de validez de la misma proteína terapéutica cuando no está fusionada con albúmina. Típicamente, el periodo de validez se refiere al periodo de tiempo durante el que la actividad terapéutica de una proteína terapéutica en disolución o en alguna otra formulación de almacenamiento, es estable sin que se dé una pérdida indebida de actividad terapéutica. Muchas de las proteínas terapéuticas son muy lábiles en su estado no fusionado. Como se describe más adelante, el periodo de validez típico de estas proteínas terapéuticas se prolonga notablemente tras la incorporación en la proteína de fusión de albúmina de la invención. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención con periodo de validez "prolongado" o "extendido" presentan una actividad terapéutica mayor con relación a un estándar que se ha sometido a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación. El estándar puede ser la proteína

terapéutica de longitud completa sin fusionar. Cuando la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es un análogo, una variante o está modificada de otro modo o no incluye la secuencia completa para esa proteína, la prolongación de la actividad terapéutica, de forma alternativa, se puede comparar con el equivalente no fusionado de ese análogo, esa variante, ese péptido modificado o esa secuencia incompleta. Como ejemplo, una

5 proteína de fusión de albúmina de la invención puede mantener más de aproximadamente el 100 % de la actividad terapéutica, o más de aproximadamente el 105 %, el 110 %, el 120 %, el 130 %, el 150 % o el 200 % de la actividad terapéutica de un estándar cuando se somete a las mismas condiciones de almacenamiento y manipulación que el estándar cuando se comparan en un punto temporal dado.

También se pueden evaluar el periodo de validez en términos de la actividad terapéutica que queda después del almacenamiento, normalizado con la actividad terapéutica cuando comenzó el almacenamiento. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención con periodo de validez prolongado o extendido que se muestra como actividad terapéutica prolongada o extendida pueden mantener más de aproximadamente el 50 % de la actividad terapéutica, aproximadamente el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 % o más de la actividad terapéutica de la proteína terapéutica equivalente no fusionada cuando se somete a las mismas condiciones.

### 15 **Expresión de proteínas de fusión**

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden producir como moléculas recombinantes por secreción de una levadura, un microorganismo tal como una bacteria o una línea celular humana o animal. Preferentemente, el polipéptido se secreta de las células huésped.

En el presente documento también se divulga una construcción de ADN que codifica una secuencia señal eficaz para dirigir la secreción en levaduras, en particular una secuencia señal derivada de levaduras (especialmente una que sea homóloga al huésped de la levadura), y la molécula fusionada del primer aspecto de la invención, sin que exista una pro secuencia derivada de levaduras entre la señal y el polipéptido maduro.

La señal de la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* es un ejemplo preferente de una secuencia señal derivada de levaduras.

25 No se contemplan conjugados de tipo de los preparados por Poznansky et al., (FEBS Lett. 239:18 (1988)), en los que se unen polipéptidos preparados por separado por entrecruzamiento químico.

La presente invención incluye también una célula, preferentemente una célula de levadura transformada para que exprese una proteína de fusión de albúmina de la invención. Además de las propias células huésped transformadas, la presente invención también contempla un cultivo de esas células, preferentemente un cultivo monoclonal

30 (clonalmente homogéneo) o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente. Si se secreta el polipéptido, el medio contendrá el polipéptido, con las células, o sin las células, si se han filtrado o retirado por centrifugación. Se conocen y se pueden usar muchos sistemas de expresión, incluidos bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*), hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insectos.

35 Las cepas de levaduras preferentes para su uso en la producción de proteínas de fusión de albúmina son D88, DXY1 y BXP10. La D88 [leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4] derivada de la cepa progenitora AH22his+ (conocida también como DB1; véase, p. ej., Sleep et al. Biotechnology 8:42-46 (1990)). La cepa contiene una mutación leu2 que permite la selección auxótrofa de plásmidos de 2 micrómetros de base que contienen el gen LEU2. La D88 también presenta una desrepresión de PRB-1 en exceso de glucosa. Normalmente, el promotor PRB1 está controlado por dos puntos de control que realizan un seguimiento de la concentración de glucosa y la fase de crecimiento. El promotor se activa en levaduras naturales al disminuir la glucosa y entrar en la fase estacionaria. La cepa D88 presenta la represión por glucosa, pero mantiene la inducción al entrar en la fase estacionaria. El gen PRA1 codifica una proteasa vacuolar de levaduras, la endoproteasa A de YscA A, que se localiza en el RE. El gen UBC4 está en la ruta de la ubiquitinación y participa en la dirección de proteínas de corta duración y anómalas para su degradación dependiente de la ubiquitina. Se descubrió que el aislamiento de esta mutación ubc4 aumentaba el

40 número de copias de un plásmido de expresión en la célula y originaba un aumento del nivel de expresión de una proteína deseada expresada a partir del plásmido (véase, p. ej., la publicación internacional N.º W099/00504).

La DXY1, derivada de D88, tiene el siguiente genotipo: [leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3::yap3]. Además de las mutaciones aisladas en D88, esta cepa también tiene una inactivación de la proteasa YAP3. Esta proteasa provoca la escisión de residuos principalmente dibásicos (RR, RK, KR, KK), pero también puede promover la escisión en residuos monobásicos de proteínas. El aislamiento de esta mutación yap3 dio lugar a mayores niveles de producción de SAH de longitud completa (véanse, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 5.965.386 y Kerry-Williams et al., Yeast 14:161-169 (1998)).

La BXP10 tiene el siguiente genotipo: leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3, yap3::URA3, lys2, hsp150::LYS2, pmt1::URA3. Además de las mutaciones aisladas en DXY1, esta cepa también tiene una inactivación del gen PMT1 y del gen HSP150. El gen PMT1 es un miembro de la familia evolutivamente conservada de las doliquil-fosfato-D-manosa proteína O-manosiltransferasas (Pmts). La topología transmembranaria de la Pmt1p sugiere que es una proteína integral de membrana del retículo endoplásmico con un papel en la glucosilación O-enlazada. Esta

mutación sirve para reducir/eliminar la glucosilación O-enlazada de las fusiones de SAH (véase, p. ej., la publicación internacional N.º WO00/44772). Los estudios revelaron que la proteína Hsp150 se separa de la AHr por cromatografía de intercambio iónico. La mutación del gen HSP150 retira un posible contaminante que se ha demostrado que es difícil retirar por técnicas de purificación habituales. Véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 5.783.423.

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

Las células transformadas de forma satisfactoria, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, se pueden identificar por técnicas bien conocidas. Por ejemplo, se pueden cultivar células resultantes de la inducción de una construcción de expresión para producir el polipéptido deseado. Se puede recoger y lisar las células y estudiar su contenido en ADN para determinar la presencia del ADN usando un procedimiento tal como el descrito por Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 o Berent et al. (1985) *Biotech.* 3, 208. De forma alternativa, se puede detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante usando anticuerpos.

Los vectores plasmídicos de levaduras útiles incluyen pRS403-406 y pRS413-416 y, en general, están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integradores de levaduras (Ylp) e incorporan los marcadores seleccionables de levaduras HIS3, 7GP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómero de levadura (Ycp).

Los vectores preferentes para preparar proteínas de fusión de albúmina para su expresión en levaduras incluyen pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA y pC4:SAH, que se describen con detalle en el ejemplo 2. La figura 4 muestra un mapa del plásmido pPPC0005 que se puede usar como el vector de base en el que se pueden clonar los polinucleótidos que codifican las proteínas terapéuticas para formar fusiones de AH. Contiene un promotor PRB1 de *S. cerevisiae* (PRB1p), una secuencia líder de fusión (FL), un ADN que codifica la AH (AHr) y una secuencia terminadora ADH1 de *S. cerevisiae*. La secuencia de la secuencia líder de fusión consiste en los primeros 19 aminoácidos del péptido señal de la seroalbúmina humana (SEC ID NO: 29) y los últimos cinco del promotor del factor de apareamiento alfa 1 (SLDKR, véase el documento EP-A-387 319).

Los plásmidos pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA y pC4:SAH se depositaron el 11 de abril de 2001 en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otro vector útil para expresar una proteína de fusión de albúmina en levaduras es el vector pSAC35 que se describe en Sleep et al., *BioTechnology* 8:42 (1990).

Se han desarrollado una variedad de procedimientos para unir de forma funcional ADN a vectores por medio de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, se pueden añadir tramos homopoliméricos complementarios al segmento de ADN que se va a insertar en el ADN vector. El vector y el segmento de ADN se unen entonces por enlaces de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinantes.

Los enlazadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un procedimiento alternativo de unión del segmento de ADN a los vectores. El segmento de ADN, generado por digestión con endonucleasas de restricción, se trata con la polimerasa de ADN del bacteriófago T4 la polimerasa de ADN I de *E. coli*, enzimas que retiran los extremos monocatenarios y que sobresalen con sus actividades 3' y 5'-exonucleolíticas, y que rellenan los extremos 3' rebajados con sus actividades polimerizantes.

Por lo tanto, la combinación de estas actividades genera segmentos de ADN de extremos romos. Los segmentos de extremos romos se incuban después con un gran exceso molar de moléculas enlazadoras en presencia de una enzima que también pueden catalizar la unión de moléculas de ADN de extremos romos, tal como la ligasa de ADN del bacteriófago T4. Por tanto, los productos de la reacción son segmentos de ADN portadores de secuencias enlazadoras poliméricas en sus extremos. Estos segmentos de ADN se escinden después con la enzima de restricción apropiada y se ligan a un vector de expresión que se ha escindido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.

Existen enlazadores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasas de restricción disponibles comercialmente de una serie de proveedores, incluido International Biotechnologies Inc, New Haven, CT, EE. UU.

Una manera deseable de modificar el ADN de acuerdo con la invención si, por ejemplo, se quieren preparar variantes de AH, es usar la reacción en cadena de la polimerasa como se divulga por Saiki et al. (1988) *Science* 239, 487-491. En este procedimiento, el ADN que se quiere amplificar enzimáticamente está flanqueado por dos cebadores oligonucleotídicos específicos que se incorporan en el ADN amplificado. Los cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que se pueden usar para clonar en los vectores de expresión usando procedimientos conocidos en la técnica.

Son géneros de levaduras ejemplares que se contemplan como útiles en la puesta en práctica de la presente invención como huéspedes para expresar las proteínas de fusión de albúmina *Pichia* (anteriormente clasificado como *Hansenula*), *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Zygosaccharomyces*, *Debaromyces*, *Trichoderma*,  
5 *Cephalosporium*, *Humicola*, *Mucor*, *Neurospora*, *Yarrowia*, *Metschnikowia*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Botryosacculus*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis* y similares. Son géneros preferentes los seleccionados del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulaspora*. Son ejemplos de especies de *Saccharomyces* *S. cerevisiae*, *S. italicus* y *S. rouxii*.

10 Son ejemplos de especies de *Kluyveromyces* *K. fragilis*, *K. lactis* y *K. marxianus*. Una especie de *Torulaspora* adecuada es *T. delbrueckii*. Son ejemplos de especies de *Pichia* (*Hansenula*) *P. angusta* (anteriormente *H. polymorpha*), *P. anomala* (anteriormente *H. anomala*) y *P. pastoris*. En los documentos EP 251 744, EP 258 067 y WO 90/01063 se enseñan de forma general procedimientos para la transformación de *S. cerevisiae*.

15 Las especies ejemplares preferentes de *Saccharomyces* incluyen *S. cerevisiae*, *S. italicus*, *S. diastaticus* y *Zygosaccharomyces rouxii*. Las especies ejemplares preferentes de *Kluyveromyces* incluyen *K. fragilis* y *K. lactis*. Las especies ejemplares preferentes de *Hansenula* incluyen *H. polymorpha* (actualmente *Pichia angusta*), *H. anomala* (actualmente *Pichia anomala*) y *Pichia capsulata*. Otras especies ejemplares preferentes de *Pichia* incluyen *P. pastoris*. Las especies ejemplares preferentes de *Aspergillus* incluyen *A. niger* y *A. nidulans*. Las especies ejemplares preferentes de *Yarrowia* incluyen *Y. lipolytica*. Muchas especies de levaduras preferentes están disponibles de la ATCC. Por ejemplo, las siguientes especies de levaduras preferentes están disponibles de la ATCC  
20 y son útiles en la expresión de proteínas de fusión de albúmina: *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, mutante yap3 teleomorfo de la cepa BY4743 (N.º de acceso de la ATCC 4022731); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, mutante hsp150 teleomorfo de la cepa BY4743 (N.º de acceso de la ATCC 4021266); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, mutante pmtl teleomorfo de la cepa BY4743 (N.º de acceso de la ATCC 4023792); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorfo (N.º de acceso 20626, 44773, 44774 y 62995); *Saccharomyces diastaticus* Andrews et Gilliland ex van der Walt, teleomorfo (N.º de acceso de la ATCC 62987); *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt, teleomorfo (N.º de acceso de la ATCC 76492); *Pichia angusta* (Teunisson et al.) Kurtzman, teleomorfo depositado como *Hansenula polymorpha* de Morais et Maia, teleomorfo (N.º de acceso de la ATCC 26012); *Aspergillus niger* van Tieghem, anamorfo (N.º de acceso de la ATCC 9029); *Aspergillus niger* van Tieghem, anamorfo (N.º de acceso de la ATCC 16404); *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, anamorfo (N.º de acceso de la ATCC 48756); y *Yarrowia lipolytica* (Wickerham et al.) van der Walt et von Arx, teleomorfo (N.º de acceso de la ATCC 201847).

25 Los promotores adecuados para *S. cerevisiae* incluyen los asociados con el gen PGKI, o los genes GAL1 o GAL10, CYCI, PHO5, TRPI, ADHI, ADH2, los genes para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, glucocinasa, la feromona factor de apareamiento alfa, [feromona factor de apareamiento a], el promotor PRBI, el promotor GUT2, el promotor GPDI  
30 y promotores híbridos que implican híbridos de partes de regiones reguladoras en 5' con partes de regiones reguladoras en 5' de otros promotores o con sitios de activación corriente arriba (p. ej., el promotor del documento EP-A-258 067).

35 Son promotores regulables convenientes para su uso en *Schizosaccharomyces pombe* el promotor reprimible por tiamina del gen nmt descrito por Maundrell (1990) J. Biol. Chem. 265, 10857-10864 y el promotor reprimible por glucosa del gen jopl descrito por Hoffman y Winston (1990) Genetics 124, 807-816.

40 Se enseñan procedimientos para transformar *Pichia* para la expresión de genes exógenos, por ejemplo, en Cregg et al. (1993), y diversas patentes de Phillips (p. ej., en el documento US 4 857 467), y existen kits de expresión en *Pichia* disponibles comercialmente de Invitrogen BV, Leek, Países Bajos, e Invitrogen Corp., San Diego, California. Los promotores adecuados incluyen AOX1 y AOX2. Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465 incluyen información sobre vectores y transformación de *Hansenula*, siendo los promotores adecuados MOX1 y FMD1; mientras que el documento EP 361 991, Fleer et al. (1991) y otras publicaciones de Rhone-Poulenc Rorer enseñan cómo expresar proteínas exógenas en especies de *Kluyveromyces*, siendo un promotor adecuado PGKI.

45 Preferentemente, la señal de terminación de la transcripción es la secuencia flanqueante en 3' de un gen eucariota que contiene señales adecuadas para la terminación de la transcripción y de poliadenilación. Pueden ser secuencias flanqueantes en 3' adecuadas, por ejemplo, las del gen enlazado de forma natural a la secuencia de control de la expresión usada, es decir, pueden corresponder al promotor. De forma alternativa, pueden ser diferentes, en cuyo caso se prefiere la señal de terminación del gen ADHI de *S. cerevisiae*.

50 La proteína de fusión de albúmina deseada se puede expresar inicialmente con una secuencia líder de secreción, que puede ser cualquier líder eficaz en la levadura escogida. Los líderes útiles en *S. cerevisiae* incluyen el del factor de apareamiento polipéptido a (MF a-1) y los líderes híbridos del documento EP-A-387 319. La levadura escinde estos líderes (o señales) antes de que se libere la albúmina madura al medio circundante. Otros líderes de este tipo incluyen los de la invertasa (SUC2) divulgada en el documento JP 62-096086 (concedido como 911036516), la fosfatasa ácida (PHO5), la presecuencia del MFa-1, la glucanasa 0 (BGL2) y la toxina "killer" de *S. cerevisiae*; la glucoamilasa II de *S. diastaticus*; la  $\alpha$ -galactosidasa de *S. carlsbergensis* (MEL1); la toxina "killer" de *K. lactis*; y la glucoamilasa de *Candida*.



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

En el presente documento también se divulgan vectores que contienen un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, células huésped y la producción de proteínas de fusión de albúmina por técnicas sintéticas y recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, un plásmido, vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes para la replicación o defectivos para la replicación. En este último caso, la propagación vírica se producirá, en general, solamente al complementar las células huésped.

Los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para su propagación en un huésped. En general, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, se puede incluir *in vitro* usando una línea celular de empaquetado apropiada y transducirlo después en células huésped.

El inserto de polinucleótido debería enlazarse de forma funcional a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de las LTR víricas, por mencionar algunos. El experto en la técnica conocerá otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para la iniciación de la transcripción, la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. Preferentemente, la porción codificante de los transcritos expresada por las construcciones incluirá un codón de iniciación de la traducción al principio y un codón de terminación de la traducción (UAA, UGA o UAG) ubicado apropiadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

Como se indica, preferentemente, los vectores de expresión incluirán al menos un marcador seleccionable. Los marcadores de este tipo incluyen dihidrofolato reductasa, G418, glutamina sintasa o resistencia a la neomicina para cultivo de células eucariotas, y los genes de resistencia a la tetraciclina, a la kanamicina o a la ampicilina para cultivos de *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levaduras (p. ej., de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (N.º de acceso de la ATCC 201178)); células de insectos tales como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*; células animales tales como células CHO, COS, NSO, 293 y de melanoma de Bowes; y células vegetales. En la técnica se conocen condiciones y medios de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente.

Entre los vectores preferentes para su uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH.16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferentes se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Los vectores de expresión preferentes para su uso en sistemas de levaduras incluyen, pero sin limitación, pYES2, pYD1 pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S 1, pPIC3.5K, pPIC9K y PA0815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el experto en la técnica resultarán fácilmente evidentes otros vectores adecuados.

En un modo de realización, se pueden fusionar polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención con secuencias señal que dirigirán la localización de una proteína de la invención en compartimentos particulares de una célula procariota o eucariota y/o que dirigirán la secreción de una proteína de la invención de una célula procariota o eucariota. Por ejemplo, en *E. coli*, se puede desear dirigir la expresión de la proteína al espacio periplásmico. Los ejemplos de secuencias señal o proteínas (o fragmentos de las mismas) a las que se pueden fusionar las proteínas de fusión de albúmina de la invención con el fin de dirigir la expresión del polipéptido al espacio periplásmico de las bacterias incluyen, pero sin limitación, la secuencia señal de pelB, la secuencia señal de la proteína de unión a maltosa (MBP), la MBP, la secuencia señal de ompA, la secuencia señal de la subunidad B de la enterotoxina termolábil periplásmica de *E. coli* y la secuencia señal de la fosfatasa alcalina. Existen varios vectores disponibles comercialmente para la construcción de proteínas de fusión que dirigirán la localización de una proteína, tal como la serie de vectores pMAL (en particular la serie pMAL-p) disponible de New England Biolabs. En un modo de realización específico, se pueden fusionar polinucleótidos proteínas de fusión de albúmina de la invención con la secuencia señal de la peptidasa pelB para aumentar la eficacia de la expresión y la purificación de los polipéptidos de este tipo en bacterias gramnegativas. Véanse las patentes de EE. UU. N.º 5.576.195 y 5.846.818.

Los ejemplos de péptidos señal que se pueden fusionar con una proteína de fusión de albúmina de la invención con el fin de dirigir su secreción en células de mamíferos incluyen, pero sin limitación, la secuencia señal de MPlF-1 (p. ej., los aminoácidos 1-21 del número de acceso de GenBank AAB51134), la secuencia señal de la estañocalcina (MLQNSAVLLLLVISASA, SEC ID NO: 34) y una secuencia señal consenso (MPTWAWWLFLVLLLALWAPARG, SEQ ID NO: 35). Una secuencia señal adecuada que se puede usar junto con sistemas de expresión baculovíricos es la secuencia señal de gp67 (p. ej., los aminoácidos 1-19 del número de acceso de GenBank AAA72759).

Los vectores que usan glutamina sintasa (GS) o DHFR como marcadores seleccionables se pueden amplificar en

presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores a base de glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (p. ej., la línea celular murina de mieloma, NSO) que son negativas para glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden funcionar en células que expresan glutamina sintasa (p. ej., células de ovario de hámster chino (CHO)) al proporcionar un inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno. Se detallan un sistema de expresión de glutamina sintasa y componentes del mismo en las publicaciones PCT: WO87/04462, WO86/05807, WO89/01036, WO89/10404 y WO91/06657. Adicionalmente, los vectores de expresión de glutamina sintasa se pueden obtener de Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y producción de anticuerpos monoclonales usando un sistema de expresión de GS en células murinas de mieloma se describe en Bebbington et al., *Bioltechnology* 10:169(1992) y en *Biblia y Robinson Biotechnol. Prog.* 11:1 (1995).

La presente invención también se refiere a células huésped que contienen las construcciones de vector descritas anteriormente en el presente documento y, adicionalmente, engloba células huésped que contienen secuencias de nucleótidos de la invención que están asociadas de forma funcional con una o más regiones de control heterólogas (p. ej., promotor y/o potenciador) usando técnicas conocidas en la técnica. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero (p. ej., una célula obtenida de un ser humano), o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. Se puede escoger una cepa huésped que module la expresión de las secuencias génicas insertadas o que modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. La expresión de determinados promotores puede ser elevada en presencia de determinados inductores; por tanto, se puede controlar la expresión del polipéptido genomanipulado. Además, las diferentes células huésped tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación traduccionales y postraduccionales (p. ej., fosforilación, escisión) de las proteínas. Se pueden escoger líneas celulares apropiadas para garantizar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína exógena expresada.

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

Además de englobar células huésped que contienen las construcciones de vector analizadas en el presente documento, la invención también engloba células huésped primarias, secundarias e inmortalizadas de origen vertebrado, en particular de origen mamífero, que se han genomanipulado para delecionar o reemplazar material genético endógeno (p. ej., se puede reemplazar la secuencia codificante correspondiente a una proteína terapéutica con una proteína de fusión de albúmina que corresponda a la proteína terapéutica) y/o para incluir material genético (p. ej., se pueden incluir secuencias polinucleotídicas heterólogas tales como, por ejemplo, una proteína de fusión de albúmina de la invención que corresponda a la proteína terapéutica). El material genético asociado de forma funcional con el polinucleótido endógeno puede activar, modificar y/o amplificar polinucleótidos endógenos.

Además, se pueden usar técnicas conocidas en la técnica para asociar de forma funcional polinucleótidos heterólogos (p. ej., polinucleótidos que codifican una proteína albúmina o un fragmento o variante de la misma) y/o regiones de control heterólogas (p. ej., promotor y/o potenciador) con secuencias polinucleotídicas endógenas que codifican una proteína terapéutica por medio de recombinación homóloga (véanse, p. ej., la patente de EE. UU. 5.641.670, publicada el 24 de junio de 1997; la publicación internacional número WO 96/29411; la publicación internacional número WO 94/12650; Koller et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989).

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden recuperar y purificar de cultivos celulares por procedimientos bien conocidos que incluyen la precipitación en sulfato de amonio o etanol, la extracción ácida, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía en fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de afinidad, la cromatografía en hidroxapatita, la cromatografía de interacción de cargas hidrófobas y la cromatografía de lectinas. Lo más preferentemente, para la purificación se emplea la cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("HPLC").

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando la cromatografía de intercambio aniónico, que incluye, pero sin limitación, la cromatografía en columnas de Q-sefarosa, sefarosa DEAE, poros HQ, poros, DEAE, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q y DEAE, Fractogel Q y DEAE.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando la cromatografía de intercambio catiónico, que incluye, pero sin limitación, columnas de SP-sefarosa, sefarosa CM, poros HS, poros CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Resource/Source S y CM, Fractogel S y CM y sus equivalentes y asimilables.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando cromatografía de interacción hidrófoba, que incluye, pero sin limitación, columnas de fenilo, butilo, metilo, octilo, hexil-sefarosa, poros fenilo, butilo, metilo, octilo, hexilo, Toyopearl fenilo, butilo, metilo, octilo, hexilo, Resource/Source fenilo, butilo, metilo, octilo,

hexilo, Fractogel fenilo, butilo, metilo, octilo, hexilo y sus equivalentes y asimilables.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando la cromatografía de exclusión por tamaño, que incluye, pero sin limitación, columnas de sefarosa S100, S200, S300, de resinas Superdex y sus equivalente y asimilables.

- 5 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando la cromatografía de afinidad, que incluye, pero sin limitación, columnas de afinidad por tinciones miméticas, de afinidad por péptidos y de afinidad por anticuerpos que son selectivas para la SAH o las moléculas "objetivo de fusión".

10 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando uno o más procedimientos de cromatografía enumerados anteriormente. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando una o más de las siguientes columnas de cromatografía: columna FF de Q sefarosa, columna FF de SP sefarosa, columna de alto rendimiento de Q sefarosa, columna FF de Blue sefarosa, columna Blue, columna FF de fenil sefarosa, columna FF o metil DEAE sefarosa.

15 Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando el procedimiento descrito en la publicación internacional N.º WO00/44772. Un experto en la técnica podría modificar con facilidad el procedimiento descrito en ese documento para su uso en la purificación de proteínas de fusión de albúmina de la invención.

20 Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden recuperar de productos producidos por técnicas recombinantes de un huésped procarionota o eucariota, incluidas, por ejemplo, células bacterianas, de levaduras, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. En función del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden ser glucosilados o no glucosilados. Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden incluir un residuo inicial de metionina modificado, en algunos casos como consecuencia de procedimientos mediados por el huésped. Por tanto, es bien conocido en la técnica que, en general, en todas las células eucariotas, después de la traducción se retira de cualquier proteína con gran eficacia la metionina N-terminal codificada por el codón de iniciación de la traducción. Si bien la metionina N-terminal de la mayoría de las proteínas también se retira eficazmente en la mayoría de los procarionotas, para algunas proteínas este procedimiento de retirada procarionota es ineficaz, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al que está enlazada covalentemente la metionina N-terminal.

30 En un modo de realización, se usa la levadura *Pichia pastoris* para expresar proteínas de fusión de albúmina de la invención en un sistema eucariota. La *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica que pueden metabolizar metanol como su única fuente de carbono. Una etapa principal de la ruta de metabolización de metanol es la oxidación del metanol a formaldehído usando O<sub>2</sub>. Esta reacción la cataliza la enzima alcohol oxidasa. Con el fin de metabolizar el metanol como su única fuente de carbono, la *Pichia pastoris* debe generar niveles elevados de alcohol oxidasa debido, en parte, a la afinidad relativamente baja de la alcohol oxidasa por el O<sub>2</sub>. En consecuencia, en un medio de cultivo que depende del metanol como fuente de carbono principal, la región promotora de uno de los dos genes de la alcohol oxidasa (AOX1) es muy activo. En presencia de metanol, la alcohol oxidasa producida a partir del gen AOX1 comprende hasta aproximadamente el 30 % de la proteína soluble de la *Pichia pastoris*. Véanse Ellis, S.B., et al., Mol. Cell. Biol. 5:1111-21 (1985); Koutz, P.J., et al., Yeast 5:167-77 (1989); Tschopp, J.F., et al., Nucl. Acids Res. 15: 3859-76 (1987). Por tanto, una secuencia codificante heteróloga tal como, por ejemplo, un polinucleótido de la presente invención, con la regulación transcripcional de la totalidad o parte de la secuencia reguladora de AOX1 se expresa a niveles excepcionalmente altos en levaduras *Pichia* cultivadas en presencia de metanol.

45 En un ejemplo, se usa el vector plasmídico pPIC9K para expresar ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención, como se expone en el presente documento, en un sistema de levadura *Pichia* esencialmente como se describe en "Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology", D.R. Higgins y J. Cregg, eds. The Humana Press, Totowa, NJ, 1998. Este vector de expresión permite la expresión y la secreción de un polipéptido de la invención gracias al promotor AOX1 fuerte enlazado al péptido señal de secreción (es decir, líder) de la fosfatasa alcalina (PHO) de *Pichia pastoris* situado corriente arriba de un sitio de clonación múltiple.

50 Se podrían usar muchos otros vectores de levadura en lugar de pPIC9K, tales como pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalfa, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K y PA0815, como apreciaría con facilidad un experto en la técnica, siempre que la construcción de expresión de la construcción propuesta proporcione señales localizadas de forma apropiada para la transcripción, la traducción, la secreción (si se desea) y similares, incluido un AUG en fase, según sea necesario.

55 En otro modo de realización, se puede llevar a cabo la expresión de niveles elevados de una secuencia codificante heteróloga, tal como, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, clonando el polinucleótido heterólogo de la invención en un vector de expresión tal como, por ejemplo, pGAPZ o pGAPZalfa, y hacer crecer el cultivo de levadura en ausencia de metanol.

La invención engloba proteínas de fusión de albúmina de la presente invención que se modifican de forma diferencial durante o después de la traducción, p. ej., por glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo u otro ligando

celular, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluidas, pero sin limitación, escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH<sub>4</sub>, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc.

- 5 Otras modificaciones postraduccionales que engloba la invención incluyen, por ejemplo, p. ej., cadenas de hidratos de carbono N-enlazadas u O-enlazadas, procesamiento de extremos N-terminales o C-terminales, unión de restos químicos al esqueleto de aminoácidos, modificaciones químicas de cadenas de hidratos de carbono N-enlazados u O-enlazados y adición o deleción de un residuo de metionina N-terminal como consecuencia de la expresión en células huésped procariotas. Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden modificar con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento de la proteína.

15 Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acuorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen yodo (<sup>121</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), carbono (<sup>14</sup>C), azufre (<sup>35</sup>S), tritio (<sup>3</sup>H), indio (<sup>111</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>113m</sup>In, <sup>115m</sup>In), tecnecio (<sup>99</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc), talio (<sup>201</sup>Tl), galio (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), paladio (<sup>103</sup>Pd), molibdeno (<sup>99</sup>Mo), xenón (<sup>133</sup>Xe), flúor (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh y <sup>97</sup>Ru.

20 En modos de realización específicos, las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención o fragmentos o variantes de las mismas se unen a quelantes macrocíclicos que se asocian con iones radiometálicos, incluidos, pero sin limitación, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>166</sup>Ho y <sup>153</sup>Sm, a polipéptidos. En un modo de realización preferente, el ion radiometálico asociado con los quelantes macrocíclicos es <sup>111</sup>In. En otro modo de realización preferente, el ion radiometálico asociado con el quelante macrocíclico es <sup>90</sup>Y. En modos de realización específicos, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). En otros modos de realización específicos, el DOTA se une a un anticuerpo de la invención o fragmento del mismo por medio de una molécula enlazadora. En la técnica se conocen comúnmente ejemplos de moléculas enlazadoras útiles para conjugar el DOTA con un polipéptido (véanse, por ejemplo, DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4(10):2483-90 (1998); Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4):553-7 (1999); y Zimmerman et al, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50 (1999)).

35 Como se ha mencionado, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden modificar bien mediante procesos naturales, tales como el procesamiento postraduccionales, o bien por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o en distinto grado en varios sitios de un polipéptido dado. Los polipéptidos de la invención pueden estar ramificados, por ejemplo, como consecuencia de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser consecuencia de los procesos naturales postraduccionales o se pueden preparar por procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o un derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o un derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación, mediada por ARN transferente y ubiquitinación. (Véanse, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992)).

50 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y los anticuerpos que se unen a una proteína terapéutica o fragmentos o variantes de la misma se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En modos de realización preferentes, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la marca que se proporciona en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina permite la purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, la marca "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y la marca "flag".

60 Además, se puede conjugar una proteína de fusión de albúmina de la invención con un resto terapéutico tal como una citotoxina, p. ej., un agente citostático o citocídico, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo, p. ej., alfa-emisores como, por ejemplo, <sup>213</sup>Bi. Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio,

- emetina, nitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiaminplatino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (p. ej., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).
- Los conjugados de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada; no se debe considerar el agente terapéutico o el resto de fármaco como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Estas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como la abrina, la ricina A, la exotoxina de *Pseudomonas* o la toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, el interferón alfa, el interferón  $\beta$ , el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el activador tisular del plasminógeno, un agente apoptótico, p. ej., TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (véase la publicación internacional N.º WO 97/33899), AIM II (véase la publicación internacional N.º WO 97/34911), el ligando Fas (Takahashi et al., Int. Immunol., 6:1567-1574 (1994)). VEGI (véase la publicación internacional N.º WO 99/23105), un agente trombotico o un agente antiangiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), el factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento. Las técnicas para conjugar estos restos terapéuticos con proteínas (p. ej., proteínas de fusión de albúmina) son bien conocidos en la técnica.
- Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden unir a soportes sólidos que son particularmente útiles para inmunoensayos o para la purificación de polipéptidos que están unidos por, se unen a, o se asocian con proteínas de fusión de albúmina de la invención. Estos soportes incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.
- Las proteínas de fusión de albúmina, con o sin un resto terapéutico conjugado con ellas, administradas solas o en combinación con factores citotóxicos y/o citocinas, se pueden usar como tratamiento.
- La invención también proporciona derivados modificados químicamente de las proteínas de fusión de albúmina de la invención que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como un aumento de la solubilidad, la estabilidad y el tiempo en circulación del polipéptido, o una disminución de inmunogenicidad (véase la patente de EE. UU. N.º 14.179.337). Los restos químicos para la derivatización se pueden seleccionar de entre polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) y similares. Las proteínas de fusión de albúmina se pueden modificar en posiciones aleatorias dentro de la molécula o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula, y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.
- El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferente se encuentra entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, del peso molecular indicado) para facilitar la manipulación y la fabricación. Se pueden usar otros tamaños, en función del perfil terapéutico deseado (p. ej., la duración de la liberación mantenida deseada, los efectos sobre la actividad biológica, si los hay, la facilidad de manipulación, el grado o la ausencia de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para una proteína terapéutica o un análogo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 200, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000, 55.000, 60.000, 65.000, 70.000, 75.000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000 o 100.000 kDa.
- Como se destaca anteriormente, el polietilenglicol puede tener una estructura ramificada. Se describen polietilenglicoles ramificados, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 5.643.575; Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); y Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10; 638-646 (1999).
- Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) deberían unirse a la proteína teniendo en cuenta los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existen una serie de procedimientos de unión disponibles para los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el procedimiento divulgado en el documento EP 0 401 384 (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik et al., Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992), que informa de la pegilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo. Por ejemplo, el polietilenglicol se puede unir covalentemente a través de residuos de aminoácido por medio del grupo reactivo, tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que se puede unir una molécula de polietilenglicol activada.

Los residuos de aminoácido que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácido N-terminales; los que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuos de aminoácido C-terminal. También se pueden usar como grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol los grupos sulfhidrilo. Para fines terapéuticos es preferente la unión en un grupo amino, tal como la unión en el extremo N-terminal o en un grupo lisina.

Como se sugiere anteriormente, se puede unir polietilenglicol a proteínas por medio de un enlace a cualquiera de una serie de residuos de aminoácido. Por ejemplo, se puede enlazar polietilenglicol a proteínas por medio de enlaces covalentes a residuos de lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína. Se pueden emplear una o más químicas de reacción para unir polietilenglicol a residuos de aminoácido específicos (p. ej., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína) de la proteína o a más de un tipo de residuos de aminoácido (p. ej., lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína y combinaciones de los mismos) de la proteína.

Se pueden desear específicamente proteínas modificadas químicamente en el extremo N-terminal. Usando polietilenglicol como ilustración de la presente composición, se puede seleccionar de entre una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.) la proporción de moléculas de polietilenglicol y moléculas de proteína (polipéptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que se va a realizar y el procedimiento de obtención de la proteína pegilada en el extremo N-terminal seleccionada. El procedimiento de obtención de la preparación pegilada en el extremo N-terminal (es decir, separar este resto de otros restos monopegilados si es necesario) puede ser por purificación del material pegilado en el extremo N-terminal de una población de proteínas pegiladas. Se pueden obtener proteínas selectivas modificadas químicamente en la modificación del extremo N-terminal por alquilación reductora que aprovecha la diferente reactividad de los diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al N-terminal) disponibles para la derivatización en un proteína en particular. En las condiciones de reacción apropiadas, se obtiene una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N-terminal con un polímero que contiene grupos carbonilo.

Como se indica anteriormente, la pegilación de las proteínas de fusión de albúmina de la invención se puede llevar a cabo por cualquiera de una serie de medios. Por ejemplo, se puede unir polietilenglicol a la proteína de fusión de albúmina bien directamente o por un enlazador que intermedio. Se describen sistemas sin enlazadores para unir polietilenglicol a proteínas en Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992); en Francis et al., Intern. J. of Hematol. 68:1-18 (1998); en la patente de EE. UU. N.º 4.002.531; en la patente de EE. UU. N.º 5.349.052; en el documento WO 95/06058; y en el documento WO 98/32466.

Un sistema para unir directamente polietilenglicol a residuos de aminoácido de proteínas sin un enlazador intermedio emplea MPEG tresilado, que se produce por la modificación de monometoxipolietilenglicol (MPEG) usando cloruro de tresilo ( $\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ ). Después de la reacción de la proteína con MPEG tresilado, se une el polietilenglicol directamente a grupos amino de la proteína. Por tanto, la invención incluye conjugados de proteína y polietilenglicol producidos al hacer reaccionar proteínas de la invención con una molécula de polietilenglicol que tiene un grupo 2,2,2-trifluoroetanosulfonilo.

También se pueden unir polietilenglicoles a proteínas usando una serie de enlazadores intermedios diferentes. Por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.612.460 divulga enlazadores de uretano para conectar polietilenglicol a proteínas. También se pueden producir conjugados de proteína y polietilenglicol en los que el polietilenglicol se une a la proteína por un enlazador por reacción de proteínas con compuestos tales como MPEG-succinimidilsuccinato, MPEG activado con 1,1'-carbonildiimidazol, MPEG-2,4,5-triclorofenilcarbonato, MPEG-p-nitrofenilcarbonato y diversos derivados de MPEG-succinato. En la publicación internacional N.º WO 98/32466 se describen una serie de derivados de polietilenglicol adicionales y químicas de reacción para unir polietilenglicol a proteínas. Los productos de proteína pegilados producidos usando las químicas de reacción expuestas en el presente documento se incluyen en el alcance de la invención.

El número de restos de polietilenglicol unidos a cada proteína de fusión de albúmina de la invención (es decir, el grado de sustitución) también puede variar. Por ejemplo, las proteínas pegiladas de la invención pueden estar enlazadas, como promedio, a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 o más moléculas de polietilenglicol. De modo similar, el grado de sustitución promedio se encuentra en intervalos tales como 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 o 18-20 restos de polietilenglicol por molécula de proteína. Se analizan procedimientos para determinar el grado de sustitución, por ejemplo, en Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9: 249-304 (1992).

Los polipéptidos de la invención se pueden recuperar y purificar de síntesis química y cultivos celulares recombinantes por procedimientos habituales que incluyen, pero sin limitación, la precipitación en sulfato de amonio o etanol, la extracción ácida, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía en fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de afinidad, la cromatografía en hidroxipatita y la cromatografía de lectinas. Lo más preferentemente, para la purificación se emplea la cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("HPLC"). Se pueden emplear técnicas bien conocidas para replegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o la purificación.

La presencia y la cantidad de proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden determinar usando un

ELISA, un inmunoensayo bien conocido en la técnica. Un protocolo de ELISA que sería útil para detectar/cuantificar las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprende las etapas de recubrir una placa de ELISA con un anticuerpo anti-seroalbúmina humana, bloquear la placa para evitar la unión inespecífica, lavar la placa de ELISA, añadir una solución que contenga la proteína de fusión de albúmina de la invención (a una o más concentraciones diferentes), añadir un anticuerpo secundario específico anti-proteína terapéutica acoplado a un marcador detectable (descrito en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica) y detectar la presencia del anticuerpo secundario. En una versión alternativa de este protocolo, se podría recubrir la placa de ELISA con el anticuerpo específico anti-proteína terapéutica y el reactivo secundario marcado sería el anticuerpo específico anti-albúmina humana.

## 10 Usos de los polinucleótidos

Cada uno de los polinucleótidos identificados en el presente documento se pueden usar de numerosas maneras como reactivos. La siguiente descripción debería considerarse ejemplar y utiliza técnicas conocidas.

Los polinucleótidos de la presente invención son útiles para producir las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Tal como se describe con más detalle a continuación, se pueden usar polinucleótidos de la invención (que codifican proteínas de fusión de albúmina) en procedimientos de ADN recombinante útiles en ingeniería genética para preparar células, líneas celulares o tejidos que expresen la proteína de fusión de albúmina codificada por los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Los polinucleótidos de la presente invención también son útiles en el tratamiento génico. Un objetivo del tratamiento génico es insertar un gen sano en un organismo que tiene un gen defectivo, en un intento de corregir el defecto genético. Los polinucleótidos divulgados en la presente invención ofrecen un medio para dirigir estos defectos genéticos de manera muy precisa. Otro objetivo es insertar un gen nuevo que no estaba presente en el genoma del huésped, de modo que se produzca un nuevo rasgo en la célula huésped. En otros puntos del presente documento se describen más exhaustivamente ejemplos no limitantes adicionales de procedimientos de tratamiento génico que engloba la presente invención (véanse, p. ej., las secciones tituladas "Tratamiento génico" y los ejemplos 17 y 18).

## 25 Usos de los polipéptidos

Todos los polipéptidos identificados en el presente documento se pueden usar de numerosas maneras. La siguiente descripción debería considerarse ejemplar y utiliza técnicas conocidas.

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención son útiles para el tratamiento de diversos trastornos en mamíferos, preferentemente seres humanos, a saber, los descritos más adelante en el presente documento en la sección con el encabezamiento "Actividades biológicas".

## Composiciones farmacéuticas o terapéuticas

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención o formulaciones de las mismas se pueden administrar por cualquier procedimiento convencional, incluida la inyección parenteral (p. ej. subcutánea o intramuscular) o la infusión intravenosa. El tratamiento puede consistir en una única dosis o en una pluralidad de dosis a lo largo de un periodo de tiempo.

Aunque es posible administrar una proteína de fusión de albúmina de la invención sola, es preferente presentarla como una formulación farmacéutica, junto con uno o más vehículos aceptables. El/los vehículo(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de que sea(n) compatible(s) con la proteína de fusión de albúmina y no perjudicial(es) para el receptor del/de los mismo(s). Típicamente, los vehículos serán agua o solución salina, que serán estériles y sin pirógenos. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención son particularmente adecuadas para formulaciones en vehículos acuosos tales como agua, solución salina u otras soluciones isotónicas estériles sin pirógenos, debido a su periodo de validez en disolución prolongado. Por ejemplo, se pueden formular composiciones farmacéuticas de la invención por adelantado en forma acuosa, por ejemplo, semanas o meses o periodos de tiempo más largos antes de dispensarlas.

En casos en los que sea apropiada la administración de aerosoles, se pueden formular las proteínas de fusión de albúmina de la invención como aerosoles usando procedimientos habituales. El término "aerosol" incluye cualquier fase suspendida en gas de una proteína de fusión de albúmina de la invención que se puede inhalar en los bronquiolos o las fosas nasales. Específicamente, un aerosol incluye una suspensión en gas de gotitas de una proteína de fusión de albúmina de la invención, que se puede producir en un nebulizador o un inhalador de dosis medidas o en un pulverizador de niebla. Un aerosol también incluye una composición de polvo seco de un compuesto de la invención suspendida en aire u otro gas portador, que se puede administrar por insuflación desde un dispositivo inhalador, por ejemplo. Véanse Ganderton y Jones, Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Horwood (19 87); Gonda (1990) Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 6:273-313; y Raeburn et al., (1992) Pharmacol. Toxicol. Methods 27:143-159.

Típicamente, las formulaciones de la invención también son no inmunógenas, en parte, debido al uso de los componentes de la proteína de fusión de albúmina derivados de la propia especie. Por ejemplo, para su uso en

seres humanos, las porciones tanto de proteína terapéutica como de albúmina de la proteína de fusión de albúmina serán humanas. En algunos casos en los que el factor VII no sea de origen humano, se puede humanizar ese componente por sustitución de aminoácidos clave para que epítomos específicos se muestren al sistema inmunitario humano como de naturaleza humana en lugar de exógenos.

5 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales procedimientos incluyen la etapa de asociar la proteína de fusión de albúmina con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con  
10 vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección acuosas y no acuosas estériles que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación apropiada para el receptor al que se destina; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes  
15 de dosis unitaria o de multidosis, por ejemplo, en ampollas, viales o jeringuillas cerrados, y se pueden almacenar en condiciones de criodesecación (liofilizada) que requiere únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones de inyección extemporánea de polvos estériles. Las formulaciones de dosificación pueden contener la porción de proteína terapéutica en una concentración molar baja o una dosificación baja en comparación con la formulación  
20 habitual no fusionada para la proteína terapéutica dada la semivida en suero prolongada que presentan muchas de las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Las formulaciones o composiciones de la invención se pueden envasar junto con, o en un kit con, instrucciones o un prospecto de envase que haga referencia al periodo de validez prolongado del componente de proteína de fusión de albúmina. Por ejemplo, tales instrucciones o prospectos de envase pueden abordar condiciones de almacenamiento  
25 recomendadas, tales como el tiempo, la temperatura y la luz, teniendo en cuenta el periodo de validez extendido o prolongado de las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Tales instrucciones o prospectos de envase también pueden abordar las ventajas particulares de las proteínas de fusión de albúmina de las invenciones, tales como la facilidad de almacenamiento para las formulaciones cuyo uso puede ser necesario en sobre el terreno, fuera de las condiciones controladas de hospitales, clínicas o consultas médicas. Como se describe anteriormente, las  
30 formulaciones de la invención pueden ser en forma acuosa y se pueden almacenar en condiciones peores que las circunstancias ideales sin una pérdida significativa de actividad terapéutica.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden incluir en productos nutricéuticos. Por ejemplo, determinadas proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar en productos naturales, incluidos la leche o productos lácteos obtenidos de un mamífero transgénico que expresa la proteína de fusión de albúmina. Tales composiciones pueden incluir también plantas o productos vegetales obtenidos de una  
35 planta transgénica que expresa la proteína de fusión de albúmina. La proteína de fusión de albúmina también se puede proporcionar en forma de polvo o de comprimido, con o sin otros aditivos, vehículos, cargas y diluyentes conocidos. Se describen productos nutricéuticos en Scott Hegenhart, Food Product Design, dic. de 1993.

La invención también proporciona proteínas de fusión de albúmina para su uso en procedimientos de tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos (tales como, por ejemplo, uno cualquiera o más de las enfermedades o trastornos divulgados en el presente documento), mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención o un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención ("polinucleótido de fusión de albúmina") en un vehículo farmacéuticamente aceptable.  
40

La proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina se formularán y administrarán de una manera coherente con las prácticas médicas correctas, teniendo en cuenta la afección clínica del paciente individual (especialmente los efectos secundarios del tratamiento con la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina solos), el sitio de administración, el procedimiento de administración, la pauta posológica y otros factores conocidos por los facultativos. Por tanto, la cantidad eficaz para los fines del presente documento se determina por tales consideraciones.  
45

Como proposición general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de la proteína de fusión de albúmina administrada por vía parenteral por dosis estará en el rango de aproximadamente 1 ug/kg/día a 10 mg/kg/día de peso corporal del paciente, si bien, como se destaca anteriormente, esto estará sujeto al criterio terapéutico. Más preferentemente, esta dosis es de al menos 0,01 mg/kg/día y, lo más preferentemente para seres humanos, de entre aproximadamente 0,01 y 1 mg/kg/día para la hormona. Si se da de forma continua, típicamente, la proteína de fusión de albúmina se administra a una velocidad de dosis de aproximadamente 1 ug/kg/hora a 50 ug/kg/hora, bien por 1-4 inyecciones al día o por infusiones subcutáneas continuas, por ejemplo, usando una minibomba. También se puede emplear una bolsa de solución intravenosa. La duración del tratamiento necesaria para observar cambios y el intervalo posterior al tratamiento para que se produzcan respuestas parece variar en función del efecto deseado.  
50  
55

Las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina se pueden administrar por vía oral, rectal, parenteral,



intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como en polvos, pomadas, geles, gotas o un parche transdérmico), bucal o como un pulverizador oral o nasal. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, un diluyente, un material de encapsulado o un auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo. Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" se refiere a modos de administración que incluyen la inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrasternal, subcutánea e intraarticular y la infusión.

Las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención también se administran de forma adecuada mediante sistemas de liberación mantenida. Los ejemplos de proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de liberación mantenida se administran por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como en polvos, pomadas, geles, gotas o un parche transdérmico), bucal o como un pulverizador oral o nasal. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, un diluyente, un material de encapsulado o un auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo. Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" se refiere a modos de administración que incluyen inyecciones intravenosas, intramusculares, intraperitoneales, intrasternales, subcutáneas e intraarticulares e infusión. Los ejemplos adicionales de proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina y de liberación mantenida incluyen materiales poliméricos adecuados (tales como, por ejemplo, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas), materiales hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico y derivados escasamente solubles (tales como, por ejemplo, una sal escasamente soluble).

Las matrices de liberación mantenida incluyen polilactidas (en la patente de EE. UU. N.º 3.773.919 y el documento EP 58,481), copolímero de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., *Biopolymers* 22:547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105 (1982)), acetato de etilen vinilo (Langer et al., *Id.*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (en el documento EP 133.988).

Las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina de liberación mantenida también incluyen proteínas y/o polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención incluidos en liposomas (véanse, en general, 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. 317-327 y 353-365 (1989)). Los liposomas que contienen la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina se preparan por procedimientos conocidos por sí mismos: en el documento DE 3.218.121; en Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:3688-3692 (1985); en Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:4030-4034 (1980); en los documentos EP 52.322, EP 36.676, EP 88.046, EP 143.949, EP 142.641; en la solicitud de patente japonesa 83-118008; en las patentes de EE. UU. N.º 4.485.045 y 4.544.545; y en el documento EP 102.324. Noemalmente, los liposomas son de tipo unilamelar pequeño (de aproximadamente 200-800 Angstrom) en los que el contenido en lípidos es mayor de aproximadamente el 30 por ciento en mol de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para el tratamiento óptimo.

En otro modo de realización más, las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se administran por medio de una bomba (véanse Langer, anteriormente; 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)).

Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión por Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

Para la administración parenteral, en un modo de realización, la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina se formulan generalmente mezclándolos con el grado de pureza deseado, en una forma farmacéutica unitaria inyectable (solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no sea tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y que sea compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, preferentemente, la formulación no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para el tratamiento.

En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina uniforme e íntimamente con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos. Después, si es necesario, se conforma el producto como la formulación deseada. Preferentemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferentemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de tales vehículos transportadores incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. En el presente documento, también son útiles los vehículos no acuosos tales como los aceites fijos y el oleato de etilo, así como los liposomas.

De forma adecuada, el vehículo contiene cantidades menores de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Estos materiales son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), p. ej., poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono, incluidos celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como

manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o PEG.

5 Típicamente, la proteína de fusión de albúmina se formula en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, preferentemente a 1-10 mg/ml, a un pH de aproximadamente 3 a 8. Se entenderá que el uso de determinados de los excipientes, vehículos o estabilizantes anteriores dará lugar a la formación de sales polipeptídicas.

10 Cualquier producto farmacéutico usado para su administración terapéutica puede ser estéril. La esterilidad se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles (p. ej., membranas de 0,2 micrómetros). En general, las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina se disponen en un recipiente que tiene un punto de entrada estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

15 Normalmente, las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina se almacenarán en recipientes de dosis unitaria o de multidosis, por ejemplo, en ampollas o viales cerrados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para su reconstitución. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se rellenan viales de 10 ml con 5 ml de solución acuosa al 1 % (p/v) de proteína y/o polinucleótido de fusión de albúmina esterilizada por filtración y se liofiliza la mezcla resultante. La solución de infusión se prepara reconstituyendo la proteína y/o el polinucleótido de fusión de albúmina liofilizados usando agua para inyectables bacteriostática.

20 En un modo de realización específico y preferente, la formulación de proteína de fusión de albúmina comprende fosfato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 mM, 0,16 micromoles de octanoato de sodio/miligramo de proteína de fusión, 15 microgramos/mililitro de polisorbato 80, a pH 7,2. En otro modo de realización específico y preferente, la formulación de proteína de fusión de albúmina consiste en fosfato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 mM, 0,16 micromoles de octanoato de sodio/miligramo de proteína de fusión, 15 microgramos/mililitro de polisorbato 80, a pH 7,2. El pH y el tampón se escogen para que coincidan con las condiciones fisiológicas y la sal se añade como tonificador. Se ha escogido el octanoato de sodio debido a su conocida capacidad de aumentar la termoestabilidad de la proteína en solución. Por último, se ha añadido polisorbato como tensioactivo genérico, que reduce la tensión superficial de la solución y reduce la adsorción inespecífica de la proteína de fusión de albúmina al sistema de cierre del recipiente.

25 También se divulga en el presente documento un envase o un kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes de las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención. Asociado con tal(es) recipiente(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que refleje la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para su administración a seres humanos. Además, las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina se pueden emplear junto con otros compuestos terapéuticos.

30 Las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los agentes de proteína y/o polipéptido de fusión de albúmina que se pueden administrar en combinación con las proteínas y/o los polinucleótidos de fusión de albúmina de la invención, incluyen, pero sin limitación, agentes quimioterápicos, antibióticos, antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, agentes inmunoterápicos convencionales y/o tratamientos descritos más adelante. Las combinaciones se pueden administrar de forma concomitante, p. ej., como mezcla, por separado, pero de forma simultánea o concurrente, o secuencialmente. Esto incluye presentaciones en las que los agentes combinados se administran juntos como una mezcla terapéutica y también procedimientos en los que los agente combinados se administran por separado, pero simultáneamente, p. ej., como a través de vías intravenosas independientes en el mismo individuo. La administración "en combinación" incluye además la administración por separado de uno de los compuestos o agentes dado en primer lugar, seguido del segundo.

35 En el presente documento también se divulga un envase o un kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes de la composición farmacéutica que comprende proteínas de fusión de albúmina de la invención. Opcionalmente, asociado con tal(es) recipiente(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que refleje la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para su administración a seres humanos.

### Tratamiento génico

40 Se pueden usar construcciones que codifican proteínas de fusión de albúmina de la invención como parte de un protocolo de tratamiento génico para administrar dosis terapéuticamente eficaces de la proteína de fusión de albúmina. Un planteamiento preferente para la introducción *in vivo* de ácidos nucleicos en una célula es mediante el uso de un vector vírico que contiene un ácido nucleico, que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención. La infección de células con un vector vírico tiene la ventaja de que una gran proporción de las células objetivo pueden recibir el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas en el vector vírico, p. ej., por un ADNc contenido en el vector vírico, se expresan de forma eficaz en células que han incorporado el ácido nucleico del

vector vírico.

Se pueden usar vectores de retrovirus y vectores de virus adenoasociados como sistema de administración génica recombinante para la transferencia *in vivo* de moléculas de ácido nucleico exógenas que codifican proteínas de fusión de albúmina. Estos vectores permiten una administración eficaz de ácidos nucleicos en las células y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del huésped. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células de inclusión") que producen únicamente retrovirus defectivos para la replicación ha aumentado la utilidad de los retrovirus para el tratamiento génico, y los retrovirus defectivos se caracterizan por su uso en la transferencia génica para fines de tratamiento génico (para una revisión, véase Miller, A. D. (1990) *Blood* 76:27 1). Un retrovirus defectivo para la replicación se puede incluir en viriones que se pueden usar para infectar una célula objetivo a través del uso de un virus colaborador por técnicas habituales. Se pueden encontrar protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con estos virus en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M. et al., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio habituales.

Otro sistema de administración génica vírico útil en la presente invención usa vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus se puede modificar de tal modo que codifique y exprese un producto génico de interés pero que sea inactivo en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo vital vírico lítico normal. Véanse, por ejemplo, Berkner et al., *BioTechniques* 6:616 (1988); Rosenfeld et al. *Science* 252:431-434 (1991); y Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992). Los expertos en la técnica conocen vectores adenovíricos adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad, tipo 5 d1324, o de otras cepas de adenovirus (p. ej., Ad2, Ad3, Ad7 etc.). Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en determinadas circunstancias en cuanto que no pueden infectar células que no están en división y que se pueden usar para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluidas las epiteliales (Rosenfeld et al., (1992) citado anteriormente). Además, la partícula de virus es relativamente estable y se puede someter a purificación y concentración, y como anteriormente, se puede modificar para afectar al espectro de infectividad. Además, el ADN adenovírico introducido (y en ARN exógeno contenido en su interior) no se integra en el genoma de una célula huésped, sino que permanece episómico, de modo que se evitan posibles problemas que se pueden producir como consecuencia de mutagénesis por inserción en situaciones donde el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (p. ej., ADN retrovírico). Además, la capacidad portadora del genoma adenovírico para el ADN exógeno es grande (hasta 8 kilobases) con relación a otros vectores de administración génica (Berkner et al., citado anteriormente; Haj-Ahmand et al., *J. Virol.* 57:267 (1986)).

En otro modo de realización, los sistemas de administración génica no víricos de la presente invención se basan en rutas endocíticas para la incorporación de la molécula de nucleótidos objeto por la célula objetivo. Los sistemas de administración génica ejemplares de este tipo incluyen sistemas de administración liposómicos, conjugados de polilisina y envolturas víricas artificiales. En un modo de realización, se puede incluir una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención en liposomas portadores de cargas positivas en su superficial (p. ej., lipofectinas) y (opcionalmente) que se marcan con anticuerpos contra antígenos de superficie celular del tejido objetivo (Mizuno et al. (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-5 5 1; publicación PCT WO91/06309; solicitud de patente japonesa 1047381; y publicación de patente europea EP-A-43075).

Los sistemas de administración génica para un gen que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden introducir en un paciente por cualquiera de una serie de procedimientos. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de administración génica se puede introducir de forma sistémica, p. ej., por inyección intravenosa, y la transducción específica de la proteína en las células objetivo se produce de forma predominante de la especificidad de transfección que proporciona el vehículo de administración génica o de la expresión en el tipo de célula o el tipo de tejido debida a las secuencias reguladoras de la transcripción que controlan la expresión del gen receptor, o una combinación de las mismas. En un modo de realización, la administración inicial del gen recombinante es más limitada al ser bastante localizada la introducción en el animal. Por ejemplo, el vehículo de administración génica se puede introducir mediante un catéter (véase la patente de EE. UU. 5.328.470) o por inyección estereotáctica (p. ej. Chen et al. (1994) *PNAS* 91: 3 054-3 05 7). La preparación farmacéutica de la construcción de tratamiento génico puede consistir esencialmente en el sistema de administración génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incluye el vehículo de administración génica. Cuando se puede producir la proteína de fusión de albúmina intacta de células recombinantes, p. ej., de vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células que producen la proteína de fusión de albúmina.

#### **Procedimientos de tratamiento génico adicionales**

La invención también engloba procedimientos de tratamiento génico para tratar o evitar trastornos, enfermedades y afecciones. Los procedimientos de tratamiento génico se refieren a la introducción en un animal de secuencias de ácido nucleico (ADN, ARN y ADN o ARN antisentido) para lograr la expresión de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Este procedimiento requiere un polinucleótido que codifique una proteína de fusión de albúmina de la presente invención enlazado de forma funcional a un promotor y cualquier otro elemento genético necesario para la expresión de la proteína de fusión por el tejido objetivo. Este tratamiento génico y las técnicas de administración son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, el documento WO90/11092.

Por tanto, por ejemplo, se pueden manipular células de un paciente con un polinucleótido (ADN o ARN) que comprenda un promotor enlazado de manera funcional a un polinucleótido que codifique una proteína de fusión de albúmina de la presente invención *ex vivo*; las células manipuladas se administran después a un paciente para tratarlo con la proteína de fusión de la presente invención. Tales procedimientos son bien conocidos en la técnica.

5 Por ejemplo, véanse Beldegrun, A., et al., J. Natl. Cancer Inst. 85: 207-216 (1993); Ferrantini, M. et al., Cancer Research 53: 1107-1112 (1993); Ferrantini, M. et al., J. Immunology 153:4604-4615 (1994); Kaido, T., et al., Int. J. Cancer 60: 221-229 (1995); Ogura, H., et al., Cancer Research 50: 5102-5106 (1990); Santodonato, L., et al., Human Gene. Therapy 7:1-10 (1996); Santodonato, L., et al., Gene Therapy 4:1246-1255 (1997); y Zhang, J.-F. et al., Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996)). En un modo de realización, las células que se manipulan son células

10 arteriales. Las células arteriales se pueden introducir de nuevo en el paciente por medio de inyección directa en la arteria, los tejidos que rodean la arteria o a través de una inyección por un catéter.

Como se analiza con mayor detalle más adelante, las construcciones polinucleotídicas se pueden administrar por cualquier procedimiento que administre materiales inyectables a las células de un animal, tales como la inyección en el espacio intersticial de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado y similares). Las construcciones polinucleotídicas se pueden administrar en un vehículo líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

15

En un modo de realización, los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se administran como un polinucleótido desnudo. El término polinucleótido, ADN o ARN "desnudo" se refiere a secuencias que no tienen ningún vehículo de administración que actúe para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, incluidas secuencias víricas, partículas víricas, formulaciones de liposomas, Lipofectin o agentes de precipitación y similares. Sin embargo, también se pueden administrar polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención en formulaciones de liposomas y formulaciones de Lipofectin y similares que se pueden preparar por procedimientos bien conocidos por los expertos. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 5.593.972, 5.589.466 y 5.580.859.

20

Preferentemente, las construcciones polinucleotídicas de vector usadas en el procedimiento de tratamiento génico son construcciones que no se integrarán en el genoma del huésped ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Los vectores apropiados incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia; y pEF1/V5, pcDNA3.1 y pRc/CMV2 disponibles de Invitrogen. Para el experto en la técnica resultarán fácilmente evidentes otros vectores adecuados.

25

Se puede usar cualquier promotor fuerte conocidos por los expertos en la técnica para dirigir la expresión de la secuencia polinucleotídica. Los promotores adecuados incluyen promotores adenovíricos, tales como el promotor adenovírico tardío principal; o promotores heterólogos, tales como el promotor del citomegalovirus (CMV); el promotor del virus respiratorio sincicial (RSV); promotores inducibles, tales como el promotor del MMT, el promotor de la metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de la albúmina; el promotor del ApoA1; promotores de la globina humana; promotores de timidina cinasa víricas, tales como el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple; LTR retrovíricas; el promotor de la  $\beta$ -actina; y promotores de la hormona del crecimiento humana. El promotor también puede ser un promotor nativo para el gen correspondiente a la porción de proteína terapéutica de las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

30

35

A diferencia de otras técnicas de tratamiento génico, una de las principales ventajas de introducir secuencias de ácido nucleico desnudas en células objetivo es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. En estudios se ha demostrado que se pueden introducir secuencias de ADN que no se replican en las células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante periodos de hasta seis meses.

40

La construcción polinucleotídica se puede administrar al espacio intersticial de tejidos del interior del animal, incluidos músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículos, ovarios, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándulas y tejido conjuntivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende la matriz intercelular fluida de mucopolisacárido entre las fibras reticulares de tejidos orgánicos, las fibras elásticas de las paredes de los vasos o cámaras, las fibras de colágeno de los tejidos fibrosos o esa misma matriz dentro del tejido conjuntivo que envuelve las células musculares o en las lagunas óseas. Es asimismo el espacio ocupado por el plasma de la circulación y al fluido linfático del canal linfático. Se prefiere la administración en el espacio intersticial del tejido muscular por los motivos que se analizan a continuación. De forma conveniente, se pueden administrar por inyección en los tejidos que comprenden estas células. Preferentemente, se administran a y se expresan en células persistentes, que no están en división que están diferenciadas, aunque la administración y la expresión se pueden llevar a cabo en células no diferenciadas o diferenciadas de forma menos completa, tales como, por ejemplo, células madre sanguíneas o fibroblastos epiteliales. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para

45

50

55

incorporar y expresar polinucleótidos.

Para la inyección de secuencia de ácido nucleico desnudas, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN estará en el intervalo de desde aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, preferentemente, la dosificación será desde aproximadamente 0,005 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg y más preferentemente desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg. Obviamente, como apreciará el experto en la técnica, esta dosificación variará de acuerdo con el sitio de infección

60

del tejido. La dosificación apropiada y eficaz de la secuencia de ácido nucleico la pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica y puede depender de la afección que se está tratando y la vía de administración.

5 La vía de administración preferente es por la vía de infección parenteral en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también se pueden usar otras vías parenterales, tales como inhalación de una formulación de aerosol, en particular para la administración a los tejidos pulmonar o bronquial, la garganta o las membranas mucosas de la nariz. Además, se pueden administrar construcciones de ADN desnudo a arterias durante la angioplastia por el catéter usado en el procedimiento.

10 Los polinucleótidos desnudos se administran por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos, pero sin limitación, la inyección directa con aguja en el sitio de administración, la inyección intravenosa, la administración por vía tópica, la infusión con catéter y las llamadas "pistolas génicas". Estos procedimientos de administración son conocidos en la técnica.

Las construcciones también se pueden administrar con vehículos de administración tales como secuencias víricas, partículas víricas, formulaciones de liposomas, Lipofectin, agentes de precipitación, etc. Estos procedimientos de administración son conocidos en la técnica.

15 En determinados modos de realización, las construcciones polinucleotídicas se complejan en una preparación de liposomas. Las preparaciones liposómicas para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y preparaciones neutras. Sin embargo, son especialmente preferentes los liposomas catiónicos porque se puede formar un complejo cerrado cargado entre el liposoma catiónico y el ácido nucleico polianiónico. Se ha mostrado que los liposomas catiónicos median la  
20 administración intracelular de ADN plasmídico (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-1416), ARNm (Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:6077-6081) y factores de transcripción purificada (Debs et al., J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10192) en forma funcional.

25 Los liposomas catiónicos están disponibles fácilmente. Por ejemplo, los liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) son particularmente útiles y están disponibles con la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, N.Y. (Véase también Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416, que se incorporado en el presente documento por referencia). Otros liposomas disponibles comercialmente incluyen TransfectACE (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer).

30 Se pueden preparar otros liposomas catiónicos a partir de materiales disponibles fácilmente usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., la publicación PCT N.º WO 90/11092 (que se incorpora en el presente documento por referencia) para una descripción de la síntesis de liposomas DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano). La preparación de liposomas de DOTMA se explica en la literatura, véase, p. ej., P. Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417. Se pueden usar procedimientos similares para preparar liposomas a partir de otro material lipídico catiónico.

35 De forma similar, los liposomas aniónicos y neutros están disponibles fácilmente, tal como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.), o se pueden preparar fácilmente usando materiales disponibles fácilmente. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también se pueden mezclar con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en proporciones apropiadas. Los procedimientos para preparar liposomas usando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

40 Por ejemplo, se pueden usar dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) comerciales en diversas combinaciones para preparar liposomas convencionales, con o sin la adición de colesterol. Por tanto, por ejemplo, se pueden preparar vesículas de DOPG/DOPC secando 50 mg de cada uno de DOPG y DOPC bajo una corriente de nitrógeno gaseoso en un vial de sonicación. Se dispone la muestra en una bomba de vacío durante la noche y se hidrata al día siguiente con agua  
45 desionizada. Después, se somete a sonicación la muestra durante 2 horas en un vial tapado, usando un sonicador de Heat Systems, modelo 350, equipado con una sonda de vaso invertido (de tipo baño) a máxima potencia mientras el baño circula a 15 °C. De forma alternativa, se pueden preparar vesículas cargadas negativamente sin sonicación para producir vesículas multilamelares o por extrusión a través de membranas Nucleopore para producir vesículas unilamelares de tamaño discreto. Están disponibles otros procedimientos y son conocidos por los expertos en la  
50 técnica.

55 Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV) o vesículas unilamelares grandes (LUV), siendo preferentes las SUV. Los diversos complejos de liposomas y ácido nucleico se preparan usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Straubinger et al., Methods of Immunology (1983), 101:512-527. Por ejemplo, se pueden preparar MLV con contenido en ácidos nucleicos depositando una película fina de fosfolípidos sobre las paredes de un tubo de vidrio e hidratándola posteriormente con una solución del material que se quiere encapsular. Las SUV se preparan por sonicación prolongada de las MLV para producir una población homogénea de liposomas unilamelares. Se añade el material que se quiere incluir a una suspensión de MLV preformadas y después se sonica. Cuando se usan liposomas que contienen lípidos catiónicos,

se resuspende la película lipídica seca en una solución apropiada tal como agua estéril o una solución tamponadora isotónica tal como Tris/NaCl 10 mM, se sonica y después se mezclan los liposomas preformados directamente con el ADN. El liposoma y el ADN forman un complejo muy estable debido a la unión de los liposomas cargados positivamente al ADN catiónico. Las SUV se usan con fragmentos de ácido nucleico pequeños. Las LUV se preparan por una serie de procedimientos bien conocidos en la técnica. Los procedimientos usados comúnmente incluyen la quelación con  $\text{Ca}^{2+}$ -EDTA (Papahadjopoulos et al., Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilson et al., Cell 17:77 (1979)), la inyección de éter (Deamer, D. y Bangham, A., Biochim. Biophys. Acta 443:629 (1976); Ostro et al., Biochem., Biophys. Res. Commun. 76:836 (1977); Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3348 (1979)), las diálisis con detergente (Enoch, H. y Strittmatter, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:145 (1979)) y la evaporación en fase inversa (REV) (Fraley et al., J. Biol. Chem. 255:10431 (1980); Szoka, F. y Papahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:145 (1978); Schaefer-Ridder et al., Science 215:166 (1982)).

En general, la proporción de ADN y liposomas será desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10. Preferentemente, la proporción será desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5. Más preferentemente, la proporción será de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:3. Aún más preferentemente, la proporción será de aproximadamente 1:1.

La patente de EE. UU. N.º 5.676.954 informa sobre la inyección de material genético, complejo con vehículos liposómicos catiónicos, en ratones. Las patentes de EE. UU. N.º 4.897.355, 4.946.787, 5.049.386, 5.459.127, 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055 y la publicación internacional n.º WO 94/9469 proporcionan lípidos catiónicos para su uso en la transfección de ADN en células y mamíferos. Las patentes de EE. UU. N.º 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055 y la publicación internacional n.º WO 94/9469 proporcionan procedimientos para administrar complejos de ADN y lípidos catiónicos a mamíferos.

En determinados modos de realización, se manipulan células, *ex vivo* o *in vivo*, usando una partícula retroviral que contiene ARN que comprende una secuencia que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. Los retrovirus de los que se pueden obtener los vectores plasmídicos retrovirales incluyen, pero sin limitación, el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus de la necrosis esplénica, el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, el virus de la leucemia del gibón, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del sarcoma mieloproliferativo y el virus del tumor mamario.

El vector plasmídico retroviral se emplea para transducir líneas celulares de inclusión para formar líneas celulares productoras. Los ejemplos de células de inclusión que se pueden transfectar incluyen, pero sin limitación, las líneas celulares PE501, PA317, R-2, R-AM, A12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN descritas en Miller, Human Gene Therapy 1:5-14 (1990). El vector puede transducir las células de inclusión a través de cualquier medio conocido en la técnica. Estos medios incluyen, pero sin limitación, electroporación, el uso de liposomas y la precipitación con  $\text{CaPO}_4$ . En una alternativa, se puede encapsular el vector plasmídico retroviral en un liposoma o acoplarlo a un lípido y administrarlo después a un huésped.

La línea celular productora genera partículas de vector retroviral infecciosas que incluyen polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. Estas partículas retrovirales se pueden emplear después para transducir células eucariotas, bien *in vitro* o bien *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán una proteína de fusión de la presente invención.

En otros modos de realización determinados, se manipulan las células, *ex vivo* o *in vivo*, con polinucleótidos contenidos en un vector adenoviral. Se puede manipular el adenovirus de tal modo que codifique y exprese la proteína de fusión de la presente invención, y que al mismo tiempo sea inactivo en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo vital vírico lítico normal. La expresión del adenovirus se logra sin la integración del ADN vírico en el cromosoma de la célula huésped, de modo que se alivian las preocupaciones sobre la mutagénesis por inserción. Además, los adenovirus se han usado como vacunas vivas entéricas durante muchos años con un perfil de seguridad excelente (Schwartz et al. Am. Rev. Respir. Dis. 109:233-238 (1974)). Por último, se ha demostrado la transferencia génica mediada por adenovirus en una serie de casos, incluida la transferencia de alfa-1-antitripsina y CFTR a los pulmones de ratas algodoneras (Rosenfeld, M. A. et al. (1991) Science 252:431-434; Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143-155). Además, amplios estudios para intentar establecer los adenovirus como agente causante del cáncer en seres humanos fueron uniformemente negativos (Green, M. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:6606).

Se describen vectores adenovirales adecuados en la presente invención, por ejemplo, en Kozarsky y Wilson, Curr. Opin. Genet. Devel. 3:499-503 (1993); Rosenfeld et al., Cell 68:1443-155 (1992); Engelhardt et al., Human Genet. Ther. 4:759-769 (1993); Yang et al., Nature Genet. 7:362-369 (1994); Wilson et al., Nature 365:691-692 (1993); y la patente de EE. UU. N.º 5.652.224. Por ejemplo, el vector adenoviral Ad2 es útil y se puede hacer crecer en células 293 humanas. Estas células contienen la región E1 del adenovirus y expresan de forma constitutiva E1a y E1b, que complementan el adenovirus defectivo al proporcionar los productos de los delecionados del vector. Además del Ad2, otras variedades de adenovirus (p. ej., Ad3, Ad5 y Ad7) también son útiles en la presente invención.

Preferentemente, los adenovirus usados en la presente invención son deficientes para la replicación. Los adenovirus deficientes para la replicación necesitan la ayuda de un virus colaborador y/o una línea celular de inclusión para

formar partículas infecciosas. El virus resultante puede infectar células y puede expresar un polinucleótido de interés que está unido de forma funcional a un promotor, pero que no se puede replicar en la mayoría de las células. El adenovirus deficiente para la replicación se pueden delecionar en uno o más de la totalidad o una parte de los siguientes genes: E1a, E1b, E3, E4, E2a o de L1 a L5.

5 En otros modos de realización determinados, se manipulan las células, *ex vivo* o *in vivo*, usando un virus adenoasociado (VAA). Los VAA son virus defectivos naturales que necesitan virus colaboradores para producir partículas infecciosas (Muzyczka, N., Curr. Topics in Microbiol. Immunol. 158:97 (1992)). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no están en división. Se pueden incluir y se pueden integrar  
10 vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de VAA, pero el espacio para ADN exógeno se limita a aproximadamente 4,5 kb. En la técnica se conocen procedimientos para producir y usar estos VAA. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.139.941, 5.173.414, 5.354.678, 5.436.146, 5.474.935, 5.478.745 y 5.589.377.

Por ejemplo, un vector de VAA apropiado para su uso en la presente invención incluirá todas las secuencias necesarias para la replicación del ADN, la encapsidación y la integración en la célula huésped. La construcción polinucleotídica se inserta en el vector de VAA usando procedimientos de clonación habituales, tales como los que  
15 se encuentran en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989). Después, se transfecta el vector de VAA recombinante en células de inclusión que se infectan con un virus colaborador, usando cualquier técnica habitual, incluidas la lipofección, la electroporación, la precipitación con fosfato de calcio, etc. Los virus colaboradores apropiados incluyen adenovirus, citomegalovirus, el virus de la variolovacuna o herpesvirus. Una vez transfectadas e infectadas las células de inclusión, producirán partículas  
20 víricas de VAA infecciosas que contienen la construcción polinucleotídica. Estas partículas víricas se usan después para transducir células eucariotas, bien *ex vivo* o bien *in vivo*. Las células transducidas contendrán la construcción polinucleotídica integrada en su genoma y expresarán una proteína de fusión de la invención.

Otro procedimiento de tratamiento génico implica asociar de forma funcional regiones de control heterólogas y secuencias polinucleotídicas endógenas (p. ej., que codifican un polipéptido de la presente invención) por medio de  
25 recombinación homóloga (véanse, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 5.641.670, publicada el 24 de junio de 1997; la publicación internacional N.º WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; la publicación internacional N.º WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989). Este procedimiento implica la activación de un gen que está presente en las células objetivo, pero que normalmente no se expresa en las células o se expresa a un nivel inferior al deseado.

Usando técnicas habituales conocidas en la técnica, se preparan construcciones polinucleotídicas que contienen el  
30 promotor con secuencias dirigidas que flanquean el promotor. En el presente documento se describen promotores adecuados. La secuencia dirigida es lo suficientemente complementaria a una secuencia endógena para permitir la recombinación homóloga del promotor-secuencia dirigida con la secuencia endógena. La secuencia dirigida estará lo suficientemente próxima al extremo 5' de la secuencia polinucleotídica endógena deseada para que el promotor esté  
35 enlazado de forma funcional a la secuencia endógena tras la recombinación homóloga.

El promotor y las secuencias dirigidas se pueden amplificar usando PCR. Preferentemente, el promotor amplificado contiene distintos sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y 3'. Preferentemente, el extremo 3' de la primera secuencia dirigida contiene el mismo sitio de enzima de restricción que el extremo 5' del promotor  
40 amplificado y el extremo 5' de la segunda secuencia dirigida contiene el mismo sitio de restricción que el extremo 3' del promotor amplificado. El promotor amplificado y las secuencias dirigidas se digieren y se ligan juntos.

La construcción de promotor y secuencia dirigida se administra a las células, bien como un polinucleótido desnudo o bien junto con agentes que faciliten la transfección, tales como liposomas, secuencias víricas, partículas víricas, virus completos, Lipofectin, agentes de precipitación, etc., descritos con más detalle anteriormente. El promotor-  
45 secuencia dirigida se puede administrar por cualquier procedimiento, incluidos la inyección directa con aguja, la inyección intravenosa, la administración por vía tópica, la infusión con catéter, los aceleradores de partículas, etc. Los procedimientos se describen con más detalle a continuación.

Las células incorporan la construcción de promotor y secuencia dirigida: se produce la recombinación homóloga entre la construcción y la secuencia endógena, de tal modo que una secuencia endógena se sitúa bajo el control del promotor. Entonces, el promotor dirige la expresión de la secuencia endógena.

El polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención puede contener una  
50 secuencia señal de secreción que facilite la secreción de la proteína. Típicamente, la secuencia señal se sitúa en la región codificante del polinucleótido que se quiere expresar, hacia o en el extremo 5' de la región codificante. La secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga al polinucleótido de interés y puede ser homóloga o heteróloga a las células que se quieren transfectar. Adicionalmente, la secuencia señal se puede sintetizar químicamente usando  
55 procedimientos conocidos en la técnica.

Se puede usar cualquier modo de administración de cualquiera de las construcciones polinucleotídicas descritas anteriormente siempre que el modo dé lugar a la expresión de una o más moléculas en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Esto incluye la inyección directa con aguja, la inyección sistémica, la infusión con

catéter, los inyectores biolísticos, los aceleradores de partículas (es decir, "pistolas génicas"), esponjas de Gelfoam (esponja de gelatina) de liberación retardada, otros materiales de liberación lenta disponibles comercialmente, bombas osmóticas (p. ej., minibombas Alza), formulaciones farmacéuticas sólidas (comprimidos o pastillas) orales o supositorios y aplicaciones por trasvase o tópicas durante intervenciones quirúrgicas. Por ejemplo, la inyección directa de un plásmido desnudo precipitado con fosfato de calcio en hígado de rata y bazo de rata o de un plásmido recubierto de proteína en la vena porta ha dado lugar a la expresión génica del gen exógeno en los hígados de las ratas (Kaneda et al., Science 243:375 (1989)).

Un procedimiento de administración local preferente es por inyección directa. Preferentemente, una proteína de fusión de albúmina de la presente invención complejada con un vehículo de administración se administra por inyección directa en o localmente en el interior de la zona de las arterias. La administración de una composición localmente en el interior de la zona de las arterias se refiere a la inyección de la composición centímetros, y preferentemente milímetros, en el interior de las arterias.

Otro procedimiento de administración local es poner en contacto una construcción polinucleotídica de la presente invención en o alrededor de una herida quirúrgica. Por ejemplo, se puede someter a un paciente a una intervención quirúrgica y se puede recubrir la construcción polinucleotídica sobre la superficie del tejido del interior de la herida o se puede inyectar la construcción en zonas de tejido del interior de la herida.

Las composiciones terapéuticas útiles en la administración sistémica incluyen proteínas de fusión de la presente invención complejadas con un vehículo de administración de la presente invención dirigido. Los vehículos de administración adecuados para su uso con la administración sistémica comprenden liposomas que comprenden ligandos para dirigir el vehículo a un sitio en particular. En modos de realización específicos, los vehículos de administración adecuados para su uso con la administración sistémica comprenden liposomas que comprenden proteínas de fusión de albúmina de la invención para dirigir el vehículo a un sitio en particular.

Los procedimientos de administración sistémica preferentes incluyen la inyección intravenosa y la administración por aerosol, por vía oral y percutánea (tópica). Las inyecciones intravenosas se pueden realizar usando procedimientos habituales en la técnica. La administración por aerosol también se puede realizar usando procedimientos habituales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277-11281, 1992). La administración oral se puede realizar complejando una construcción polinucleotídica de la presente invención con un vehículo que pueda soportar la degradación por enzimas digestivas en el intestino de un animal. Los ejemplos de vehículos de este tipo incluyen cápsulas de plástico o comprimidos, tales como los conocidos en la técnica. La administración por vía tópica se puede realizar mezclando una construcción polinucleotídica de la presente invención con un reactivo lipófilo (p. ej., DMSO) que pueda pasar al interior de la piel.

La determinación de una cantidad eficaz de sustancia para su administración puede depender de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, la estructura química y la actividad biológica de la sustancia, la edad y el peso del animal, la afección concreta que requiere tratamiento y su gravedad, y la vía de administración. La frecuencia de los tratamientos depende de una serie de factores, tales como la cantidad de construcciones polinucleotídicas administradas por dosis, así como el estado de salud y los antecedentes del sujeto. El facultativo o veterinario encargado del caso determinará la cantidad precisa, el número de dosis y la pauta posológica.

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden administrar a cualquier animal, preferentemente a mamíferos y aves. Los mamíferos preferentes incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, conejos, ovejas, ganado vacuno, caballos y cerdos, siendo los seres humanos particularmente preferentes.

### Actividades biológicas

En un modo de realización preferente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención que comprenden una porción de proteína terapéutica que corresponde al factor VII, y/o fragmentos y/o variantes de las mismas, son útiles para modular la actividad hemostática (la detención de hemorragias) o trombolítica (disolución de coágulos) y/o tratar, evitar, diagnosticar, pronosticar y/o detectar trastornos relacionados con la sangre o trastornos cardiovasculares.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: preparación de proteínas de fusión de AH

La figura 1 muestra un mapa de un plásmido (pPPC0005) que se puede usar como el vector de base para clonar los ADNc de compañeros terapéuticos para formar fusiones de AH.

Este plásmido lo puede modificar con facilidad un experto en la técnica, por ejemplo, para modificar, añadir o delecionar sitios de restricción de modo que se puede clonar más fácilmente una proteína terapéutica, o un fragmento o una variante de la misma, en el vector con el fin de preparar una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Por ejemplo, con el fin de preparar una proteína de fusión de albúmina donde el resto terapéutico se sitúa en



posición N-terminal con respecto a la proteína albúmina (madura), se añadieron sitios de restricción en el extremo 5' del ADN que codifica la AH en el pPPC0005 que se muestra en la figura 1.

Debido a que se deseaba añadir sitios XhoI y ClaI exclusivos en el extremo 5' del ADN que codifica la proteína AH en el pPPC0005, en primer lugar fue necesario retirar esos mismos sitios del plásmido (situado en 3' de la secuencia terminadora ADH1). Esto se llevó a cabo cortando el pPPC0005 con XhoI y ClaI, rellenando los extremos pegajosos con la polimerasa de ADN T4 y ligando de nuevos los extremos romos para crear el pPPC0006

La introducción de los sitios de restricción XhoI y ClaI en la secuencia líder de fusión justo en 5' del ADN que codifica la proteína AH en el pPPC0006 se llevó a cabo usando dos ciclos de PCR. El primer par de oligonucleótidos son los de SEC ID NO: 19 y SEC ID NO: 20. Las SEC ID NO: 19 contiene cuatro mutaciones puntuales con relación a la secuencia de ADN que codifica la secuencia líder de fusión y el comienzo de la proteína AH. Estas mutaciones son necesarias para crear el sitio XhoI en la secuencia líder de fusión y el sitio ClaI justo al comienzo del ADN que codifica la proteína AH. Estas cuatro mutaciones están subrayadas en la secuencia que se muestra a continuación. En el pPPC0006 los nucleótidos de esas cuatro posiciones desde 5' hasta 3' son T, G, T y G. 5'-GCCTCGAGAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGATTTAAAGATTTGGG-3' (SEC ID NO: 19) 5'-AATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCTCITITCTCGAGGCTCCTGGAA TAAGC-3' (SEC ID NO: 20). Después, se realiza un segundo ciclo de PCR con un cebador flaqueante corriente arriba, 5'-TACAAACTTAAGAGTCCAATTAGC-3' (SEC ID NO: 21) y un cebador flaqueante corriente abajo 5'-CACTTCTCTAGAGTGGTTTCATATGTCTT-3' (SEC ID NO: 22). Después, se purifica el producto de PCR resultante y después se digiere con AflI y XbaI y se liga en los mismos sitios en el pPPC0006, creando el pScCHSA. El plásmido resultante tendrá un sitio XhoI introducido en la secuencia líder de fusión. La presencia del sitio XhoI crea un único cambio de aminoácido al final de la secuencia líder de fusión, de LDKR a LEKR. El cambio de D por E no estará presente en el plásmido de expresión de la proteína de fusión de albúmina final si se liga en los sitios XhoI y ClaI un fragmento que comprenda el resto terapéutico que tiene un extremo pegajoso Sall en 5' (que es compatible con el extremo XhoI) y a un extremo 3' ClaI. La ligadura de XhoI a Sall restablece la secuencia de aminoácidos original de la secuencia líder de fusión. El resto de proteína terapéutica se puede insertar después del sitio Kex2 (Kex2 escinde después de la secuencia de aminoácidos dibásicos KR al final de la secuencia líder de fusión) y antes del sitio ClaI.

#### Expresión de una proteína de fusión de albúmina en levaduras.

Después, se puede clonar el fragmento NotI que contiene el ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina N-terminal generada del pScCHSA en el sitio NotI del pSAC35.

#### Expresión de una proteína de fusión de albúmina a partir de líneas celulares de mamífero

También se ha clonado el gen SAH en el vector pC4, que es más adecuado para sistemas de cultivo de mamíferos creando el plásmido pC4:SAH. Más específicamente, se generó el pC4HSA por PCR amplificando el gen de la SAH madura con un cebador en 5' (SEC ID NO: 30) que se alinea con el extremo 5' del ADN que codifica la forma madura de la proteína SAH (p. ej., ADN del plásmido pScCHSA), incorpora sitios de clonación BamHI (mostrado en cursiva a continuación) y HindIII (mostrado subrayado individualmente a continuación), una secuencia de Kozak (mostrada con doble subrayado a continuación) y ADN que codifica el péptido señal natural de SAH (MKWVSFISLLFLFSSAYSRS�DKR, SEC ID NO: 29) (mostrado en negrita a continuación), y un cebador en 3' (SEC ID NO: 31) que se alinea con el extremo 3' del ADN que codifica la forma madura de la proteína SAH e incorpora un sitio de restricción Asp718 (mostrado en negrita a continuación). El ADN que codifica la secuencia líder de la seroalbúmina humana natural en la SEC ID NO: 30 también contiene una modificación que introduce un sitio XhoI que figura en un recuadro a continuación.

5'-TCAGGGATCCAAGCTTCCGCCACCATGAAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTCTCTTAG  
CTCGGCTTA<sup>CTCGAG</sup>GGGTGTGTTTCGTTCGAGATGCACACAAGAGTGAG-3' (SEQ ID NO:30)

5'-GCAGCGGTACCGAATTCGGCGCGCCTTATAAGCCTAAGCCAGC-3' (SEQ ID NO:31)

Después, se purifica este producto de PCR (1,85 kb) y se digiere con BamHI y Asp718 y se clona en los mismos sitios en el pC4 (N.º de acceso de la ATCC 209646) para producir el pC4:SAH

#### Preparación de vectores que comprenden proteínas de fusión de albúmina donde el resto de albúmina está en posición C-terminal con respecto al resto terapéutico usando el vector pC4:SAH

Usando el pC4:SAH, proteínas de fusión de albúmina en las que el resto de proteína terapéutica está en posición N-terminal con respecto a la secuencia de la albúmina, se puede clonar ADN que codifica una proteína terapéutica que tiene su propia secuencia señal entre los sitios BamHI (o HindIII) y ClaI. Al clonar en el sitio BamHI o HindIII se debe recordar incluir una secuencia de Kozak (CGCCACCATG) antes del codón de inicio de la transducción del ADN que codifica la proteína terapéutica que se quiere subclonar. Si la terapéutica no tiene una secuencia señal, el

ADN que codifica esa proteína terapéutica se puede clonar entre los sitios XhoI y ClaI. Cuando se usa el sitio XhoI, se pueden usar los siguientes cebadores de PCR en 5' (SEC ID NO: 32) y 3' (SEC ID NO: 33).

5'-CCGCCGCTCGAGGGGTGTGTTTCGTCGA(N)<sub>18</sub>-3' (SEQ ID NO: 32)  
5'-AGTCCCATCGATGAGCAATCACTCTTGTGCATC(N)<sub>18</sub>-3' (SEQ ID NO:33)

5 En la SEC ID NO: 32, la secuencia subrayada es un sitio XhoI; y el sitio XhoI y el ADN que sigue al sitio XhoI  
codifican los últimos siete aminoácidos de la secuencia líder de la seroalbúmina humana natural. En la SEC ID NO:  
33, la secuencia subrayada es un sitio ClaI; y el sitio ClaI y el ADN que le sigue codifican el complemento inverso del  
ADN que codifica los primeros 10 aminoácidos de la proteína SAH madura (SEC ID NO: 18). En la SEC ID NO: 32,  
10 "(N)<sub>18</sub>" es ADN idéntico a los primeros 18 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. En la SEC ID  
NO: 33, "(N)<sub>18</sub>" es el complemento inverso del ADN que codifica los últimos 18 nucleótidos que codifican la proteína  
terapéutica de interés. Usando estos dos cebadores, se puede amplificar por PCR la proteína terapéutica de interés,  
purificar el producto de PCR, digerirlo con enzimas de restricción XhoI y ClaI y después clonarlo en los sitios XhoI y  
ClaI del vector pC4:SAH.

### Ejemplo 2: expresión de una proteína de fusión de albúmina en célula de mamífero

15 Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden expresar en una célula de mamífero. Un  
vector de expresión de mamífero típico contiene un elemento promotor que media la iniciación de la transcripción del  
ARNm, una secuencia codificante de proteína y señales necesarias para la terminación de la transcripción y la  
poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias  
intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores para el ajuste de ARN. Se consigue una transcripción  
20 muy eficaz con los promotores temprano y tardío del SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, p.  
ej., RSV, HTLVI, HIV1 y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden usar  
elementos celulares (p. ej., el promotor de la actina humana).

25 Los vectores de expresión adecuados para su uso en la puesta en práctica de la presente invención incluyen, por  
ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr  
(ATCC 37146), pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0 y pCMVSPORT 3.0. Las células huésped de mamífero que  
se podrían usar incluyen, pero sin limitación, células Hela, 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de  
ratón, células Cos 1, Cos 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster  
chino (CHO).

30 De forma alternativa, se puede expresar la proteína de fusión de albúmina en líneas celulares estables que  
contengan el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de albúmina integrada en un cromosoma. La  
cotransfección con un marcador seleccionable tal como DHFR, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación  
y el aislamiento de las células transfectadas.

35 El polinucleótido que codifica la proteína de fusión transfectado también se puede amplificar para expresar grandes  
cantidades de la proteína de fusión codificada. El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar  
líneas celulares portadoras de varios cientos o incluso de varios miles de copias del gen de interés. (Véanse, p. ej.,  
Alt et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); Hamlin et al., Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143 (1990); Page  
et al., Biotechnology 9:64-68 (1991)). Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et  
al., Biochem J. 227:277-279 (1991); Bebbington et al.; Bio/Technology 10:169-175 (1992)). Usando estos  
40 marcadores, se cultivan las células de mamífero en medio selectivo y se seleccionan las células con mayor  
resistencia. Estas líneas celulares contienen el/los gen(es) amplificado(s) integrado(s) en un cromosoma. Para la  
producción de proteínas se usan con frecuencia células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO.

45 Los derivados del plásmido pSV2-dhfr (N.º de acceso de la ATCC 37146) y los vectores de expresión pC4 (N.º de  
acceso de la ATCC 209646) y pC6 (N.º de acceso de la ATCC 209647) contienen el promotor fuerte (LTR) del virus  
del sarcoma de Rous (Cullen et al., Molecular and Cellular Biology, 438-447 (marzo de 1985)) más un fragmento del  
potenciador del CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530 (1985)). Los sitios de clonación múltiples, p. ej., con los sitios  
de escisión por enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores  
también contienen el intrón en 3', la señal de poliadenilación y terminación del gen de la preproinsulina de la rata y el  
gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano del SV40.

50 Específicamente, el plásmido pC6, por ejemplo, se digiere con enzima de restricción apropiadas y después de  
desfosforila usando fosfatos intestinales de bovino por procedimientos conocidos en la técnica. Después, se aísla el  
vector de un gel de agarosa al 1 %.

55 Se genera un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención usando  
técnicas conocidas en la técnica y se amplifica este polinucleótido usando tecnología de PCR conocida en la técnica.  
Si se usa una secuencia señal natural para producir la proteína de fusión de la presente invención, el vector no  
necesita un segundo péptido señal. De forma alternativa, si no se usa una secuencia señal natural, se puede  
modificar el vector para inducir una secuencia señal heteróloga. (Véase, p. ej., la publicación internacional N.º WO  
96134891.)

El fragmento que codifica la proteína de fusión de la invención amplificado se aísla de un gel de agarosa al 1 % usando un kit disponible comercialmente ("Geneclean", BIO 101 Inc, La Jolla, Ca.). Después, se digiere el fragmento con enzimas de restricción apropiadas y se purifica de nuevo en un gel de agarosa al 1 %.

5 El fragmento que codifica la proteína de fusión de albúmina de la invención amplificado se digiere después con la misma enzima de restricción y se purifica en un gel de agarosa al 1 %. Después, se ligan el fragmento aislado y el vector desfosforilado con la ligasa de ADN T4. Después se transforman células HB101 o XL-1 Blue de *E. coli* y se identifican bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC6 usando, por ejemplo, un análisis de enzimas de restricción.

10 Para la transfección se usan células de ovario de hámster chino que carecen en un gen DHFR activo. Se cotransfectan cinco  $\mu\text{g}$  del plásmido de expresión pC6 o pC4 con 0,5  $\mu\text{g}$  del plásmido pSVneo usando Lipofectin (Felgner et al., anteriormente). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos que incluye el G418. Se siembran las células en MEM alfa menos complementado con 1 mg/ml de G418. Después de 2 días, se tripsinizan las células y se siembran en placas de clonación de hibridomas (Greiner, Alemania) en MEM alfa menos complementado con 15 10, 25 o 50 ng/ml de metotrexato más 1 mg/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días, se tripsinizan clones individuales y después se siembran en placas de Petri de 6 pocillos o matraces de 10 ml usando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Después, se transfieren los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato a placas de 6 pocillos nuevas que contienen concentraciones aún más altas de metotrexato (1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ). Se repite el mismo procedimiento hasta que se 20 obtienen clones que crecen a una concentración de 100 - 200 mM. Se analiza la expresión de la proteína de fusión deseada, por ejemplo, por SDS-PAGE y transferencia de bandas Western o mediante un análisis de HPLC en fase inversa.

### Ejemplo 3: Fusiones de multifusión

25 Las proteínas de fusión de albúmina (p. ej., que contienen una proteína terapéutica (o un fragmento o una variante de la misma) fusionada a la albúmina (o un fragmento o una variante de la misma)) se pueden fusionar adicionalmente a otras proteínas para generar "proteínas de multifusión". Estas proteínas de multifusión se pueden usar para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, la fusión de las proteínas de fusión de albúmina de la invención con la marca His, la marca AH, la proteína A, dominios IgG y la proteína de unión a maltosa facilita la purificación. (Véanse, p. ej., el documento EP A 394,827; Traunecker et al.; Nature 331:84-86 (1988)). Las señales de localización nuclear fusionadas con los polipéptidos de la presente invención pueden dirigir la proteína a una 30 ubicación subcelular específica, mientras que los heterodímeros u homodímeros covalentes pueden aumentar o reducir la actividad de una proteína de fusión de albúmina. Además, la fusión de secuencias de proteína adicionales a las proteínas de fusión de albúmina de la invención puede aumentar aún más la solubilidad y/o la estabilidad de la proteína de fusión. Las proteínas de fusión descritas anteriormente se pueden preparar usando o modificando de forma rutinaria técnicas conocidas en la técnica y/o modificando el siguiente protocolo, que describe esquemáticamente la fusión de un polipeptídicas a una molécula de IgG.

35 Brevemente, se puede amplificar por PCR la porción Fc de la molécula de IgG humana usando cebadores que abarcan los extremos 5' y 3' de la secuencia descrita a continuación. Estos cebadores también deberían tener sitios de enzimas de restricción convenientes que faciliten la clonación en un vector de expresión, preferentemente un 40 vector de expresión de mamíferos o de levaduras.

Por ejemplo, si se usa el pC4 (N.º de acceso de la ATCC 209646), se puede ligar la porción Fc humana en el sitio de clonación BamHI. Obsérvese que se debería destruir el sitio BamHI en 3'. A continuación, se restringe de nuevo el vector que contiene la porción Fc humana con BamHI, linealizando el vector, y se liga un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención (generado y aislado usando técnicas conocidas en la 45 técnica) en este sitio BamHI. Obsérvese que el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención se clona sin codón de detención, de lo contrario, no se produciría una proteína de fusión que contuviera la Fc.

Si se usa una secuencia señal natural para producir la proteína de fusión de la presente invención, el pC4 no necesita un segundo péptido señal. De forma alternativa, si no se usa la secuencia señal natural, se puede modificar el vector para incluir una secuencia señal heteróloga. (Véase, p. ej., la publicación internacional N.º WO 96/34891.)

50

**Región Fc de la IgG humana:**

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC  
 CCAGCACCTGAATTCGAGGGTGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCA  
 AGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACTCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGACG  
 TAAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG  
 TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG

TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA  
 AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA  
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA  
 TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCA  
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA  
 GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTC  
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
 AATGAGTGCGACGGCCGCGACTCTAGAGGAT (SEQ ID NO: 36)

**Ejemplo 4: procedimiento de tratamiento usando tratamiento génico - *in vivo***

- 5 Otro aspecto de la presente invención es el uso de procedimientos de tratamiento génico *in vivo* para tratar trastornos, enfermedades y afecciones. El procedimiento de tratamiento génico se refiere a la introducción en un animal de secuencias de ácido nucleico desnudo (ADN, ARN y ADN o ARN antisentido) que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden enlazar de forma funcional a (es decir, asociar con) un promotor o cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido por el tejido objetivo. Este tratamiento génico y los procedimientos y las técnicas de administración son conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos WO90/11092, WO98/11779; las patentes de EE. UU. N.º 5693622, 57051151, 5580859; Tabata et al., Cardiovasc. Res. 35(3):470-479 (1997); Chao et al., Pharmacol. Res. 35(6):517-522 (1997); Wolff, Neuromuscul. Disord. 7(5):314-318 (1997); Schwartz et al., Gene Ther. 3(5):405-411 (1996); Tsurumi et al., Circulation 94(12):3281-3290 (1996).

Las construcciones polinucleotídicas se pueden administrar por cualquier procedimiento que administre materiales inyectables a las células de un animal, tales como la inyección en el espacio intersticial de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, intestino y similares). Las construcciones polinucleotídicas se pueden administrar en un vehículo líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

- 20 El término polinucleótido, ADN o ARN "desnudo" se refiere a secuencias que no tienen ningún vehículo de administración que actúe para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, incluidas secuencias víricas, partículas víricas, formulaciones de liposomas, Lipofectin o agentes de precipitación y similares. No obstante, los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la presente invención también se pueden administrar en formulaciones de liposomas (tales como las que se enseñan en Felgner P.L. et al. (1995) Ann. NY Acad. Sci. 772:126-139 y Abdallah B. et al. (1995) Biol. Cell 85(1):1-7) que se pueden preparar por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 30 Preferentemente, las construcciones polinucleotídicas de vector usadas en el procedimiento de tratamiento génico son construcciones que no se integrarán en el genoma del huésped ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Se puede usar cualquier promotor fuerte conocidos por los expertos en la técnica para dirigir la expresión del ADN. A diferencia de otras técnicas de tratamiento génico, una de las principales ventajas de introducir secuencias de ácido nucleico desnudas en células objetivo es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. En estudios se ha demostrado que se pueden introducir secuencias de ADN que no se replican en las células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante periodos de hasta seis meses.

La construcción polinucleotídica se puede administrar al espacio intersticial de tejidos del interior de un animal, incluidos músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículos, ovarios, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándulas y tejido conjuntivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende la matriz intercelular fluida de mucopolisacárido entre las fibras reticulares de tejidos orgánicos, las fibras elásticas de las paredes de los vasos o cámaras, las fibras de colágeno de los tejidos fibrosos o esa misma matriz dentro del tejido conjuntivo que envuelve las células musculares o en las lagunas óseas. Es asimismo el espacio ocupado por el plasma de la circulación y al fluido linfático del canal linfático. Se prefiere la administración en el espacio intersticial del tejido muscular por los motivos que se analizan a continuación. De forma conveniente, se pueden administrar por inyección en los tejidos que comprenden estas células. Preferentemente, se administran a y se expresan en células persistentes, que no están en división que están diferenciadas, aunque la administración y la expresión se pueden llevar a cabo en células no diferenciadas o diferenciadas de forma menos completa, tales como, por ejemplo, células madre sanguíneas o fibroblastos epiteliales. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para incorporar y expresar polinucleótidos.

Para la inyección de polinucleótidos desnudos, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN estará en el intervalo de desde aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferentemente, la dosificación será desde aproximadamente 0,005 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg y más preferentemente desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg. Obviamente, como apreciará el experto en la técnica, esta dosificación variará de acuerdo con el sitio de inyección del tejido. La dosificación apropiada y eficaz de la secuencia de ácido nucleico la pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica y puede depender de la afección que se está tratando y la vía de administración. La vía de administración preferente es por la vía de inyección parenteral en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también se pueden usar otras vías parenterales, tales como inhalación de una formulación de aerosol, en particular para la administración a los tejidos pulmonar o bronquial, la garganta o las membranas mucosas de la nariz. Además, se pueden administrar construcciones polinucleotídicas desnudas a arterias durante la angioplastia por el catéter usado en el procedimiento.

Los efectos de respuesta a la dosis del polinucleótido inyectado en músculo *in vivo* se determinan como sigue. Se prepara un ADN molde adecuado para la producción de ARNm que codifique el polipéptido de la presente invención de acuerdo con una metodología de ADN recombinante habitual. El ADN molde, que puede ser circular o lineal, se usa como ADN desnudo o complejado con liposomas. Después, se inyectan cantidades diversas del ADN molde en los cuádriceps de ratones.

Se anestesian ratones Balb/C hembra y macho de cinco a seis semanas de edad por inyección intraperitoneal con 0,3 ml de Avertin al 2,5 %. Se practica una incisión de 1,5 cm en el muslo anterior y se visualiza directamente el cuádriceps. Se inyecta el ADN molde en 0,1 ml de vehículo en una jeringuilla de 1 cc a través de una aguja del calibre 27 durante un minuto, aproximadamente a 0,5 cm del sitio de inserción distal del músculo hacia la rodilla y de aproximadamente 0,2 cm de profundidad. Se dispone una sutura sobre el sitio de inyección para localizarlo en el futuro y se cierra la piel con clips de acero inoxidable.

Después de un tiempo de incubación apropiado (p. ej., 7 días) se preparan extractos de músculo por extirpación del cuádriceps entero. Cada quinta sección transversal de 15  $\mu$ m de los cuádriceps individuales se tiñe histoquímicamente para determinar la expresión de la proteína. Se puede realizar un curso temporal para la expresión de la proteína de fusión de manera similar, excepto porque los cuádriceps de ratones diferentes se recogen en momentos diferentes. La persistencia del ADN en el músculo después de la inyección se puede determinar por análisis de bandas de Southern después de preparar ADN celular total y sobrenadantes HIRT de ratones inyectados y de control. Los resultados de los experimentos anteriores en ratones se pueden usar para extrapolar las dosificaciones apropiadas y otros parámetros de tratamiento en seres humanos y otros animales usando ADN desnudo.

**Listado de secuencias**

5  
<110> Human Genome Sciences, Inc Novozymes Biopharma UK Limited  
<120> Proteínas de fusión de albúmina

10 <130> CSLBF/P25206EPdiv4  
<140> Documento EP 08075909.5  
<141> 01-12-2008

15 <150> Documento US 60/229.358  
<151> 12-04-2000  
  
<150> Documento US 60/256.931  
<151> 21-12-2000

20 <150> Documento US 60/199.384  
<151> 25-04-2000  
  
<160> 13

25 <170> PatentIn ver. 2.1

<210> 18  
30 <211> 585  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 18

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

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335  
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 340 345 350  
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
 355 360 365  
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380  
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415  
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430  
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445  
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460  
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495  
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
 500 505 510  
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 515 520 525  
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 530 535 540  
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
 565 570 575  
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 580 585

<210> 19

<211> 58

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221 > unión\_cebador

10 <223> cebador usado para generar los sitios XhoI y ClaI en pPPC0006

<400> 19

gcctcgagaa aagagatgca cacaagagtg aggttgctca tcgatttaaa gatttggg

58

15

<210> 20

<211> 59

<212> ADN



<213> Secuencia artificial

<220>  
 <221 > unión\_cebador  
 5 <223> cebador usado en la generación de los sitios XhoI y ClaI en pPPC0006

<400> 20  
 aatcgatgag caacctcact ctgtgtgca tctctttct cgaggctcct ggaataagc 59

10 <210>21  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <221 > unión\_cebador  
 <223> cebador usado en la generación de los sitios XhoI y ClaI en pPPC0006

20 <400> 21  
 tacaaactta agagtccaat tagc 24

<210> 22  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221 > unión\_cebador  
 <223> cebador usado en la generación de los sitios XhoI y ClaI en pPPC0006  
 30 <400> 22  
 cacttctcta gagtggtttc atatgtctt 29

<210> 29  
 <211> 24  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> señal  
 40 <223> péptido señal de la proteína seroalbúmina humana natural

<400> 29  
 Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg  
 20

45 <210> 30  
 <211> 114  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <221 > unión\_cebador  
 <223> cebador directo útil para la generación del VECTOR de fusión de albúmina PC4:HSA

<220>  
 55 <221> caract\_misc  
 <222> (5)..(10)

<223> Sitio de restricción BamHI

<220>  
 <221 > caract\_misc  
 5 <222> (11)..(16)  
 <223> Sitio de restricción Hind III

<220>  
 <221 > caract\_misc  
 10 <222> (17)..(27)  
 <223> Secuencia de Kozak

<220>  
 <221 > caract\_misc  
 15 <222> (25)..(97)  
 <223> Secuencia señal natural cds de la seroalbúmina humana

<220>  
 <221 > caract\_misc  
 20 <222> (75)..(81)  
 <223> Sitio de restricción XhoI

<220>  
 <221 > caract\_misc  
 25 <222> (98)..(114)  
 <223> Primeros seis aminoácidos cds de la seroalbúmina humana

<400> 30  
 tcaggggatcc aagcttccgc caccatgaag tgggtaacct ttatttcctc tctttttctc 60  
 tttagctcgg cttactcgag ggggtgtgtt cgtcgagatg cacacaagag tgag 114

30 <210>31  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <221 > unión\_cebador  
 <223> Cebador inverso útil para la generación del VECTOR de fusión de albúmina PC4:HSA

40 <220>  
 <221 > caract\_misc <222> (6)..(11)  
 <223> Sitio de restricción Asp718

45 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (12)..(17)  
 <223> Sitio de restricción ECORI

50 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (15)..(17)  
 <223> complemento inverso del codón de detención

55 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (18)..(25)  
 <223> Sitio de restricción ASCI

<220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (18)..(43)  
 5 <223> complemento inverso de la secuencia de ADN que codifica los últimos 9 aminoácidos  
  
 <400> 31  
 gcagcgttac cgaattcggc ggccttata agcctaaggc agc 43  
  
 10 <210> 32  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <221> unión\_cebador  
 <223> cebador directo útil para insertar una proteína terapéutica en el vector pC4:HSA  
  
 <220>  
 20 <221> caract\_misc  
 <222> (29)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 25 <221> caract\_misc  
 <222> (30)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 30 <221> caract\_misc  
 <222> (31)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 35 <221> caract\_misc  
 <222> (32)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 40 <221> caract\_misc  
 <222> (33)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 45 <221> caract\_misc  
 <222> (34)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 50 <221> caract\_misc  
 <222> (35)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 55 <221> caract\_misc  
 <222> (36)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 60 <221> caract\_misc

<222> (37)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 5 <221> caract\_misc  
 <222> (38)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 10 <221> caract\_misc  
 <222> (39)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 15 <221> caract\_misc  
 <222> (40)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 20 <221> caract\_misc  
 <222> (41)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 25 <221> caract\_misc  
 <222> (42)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 30 <221> caract\_misc  
 <222> (43)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 35 <221> caract\_misc  
 <222> (44)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 40 <221> caract\_misc  
 <222> (45)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <220>  
 45 <221> caract\_misc  
 <222> (46)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
  
 <400> 32  
 50 ccgccgctcg aggggtgtgt ttcgtcgann nnnnnnnnnn nnnnnn 46  
  
 <210> 33  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <221> unión\_cebador  
 <223> cebador inverso útil para insertar una proteína terapéutica en el vector pC4:HSA  
 60

5  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (38)  
<223> n es igual a a, t, g o c

10  
<220>  
<221 > caract\_misc  
<222> (39)  
<223> n es igual a a, t, g o c

15  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (40)  
<223> n es igual a a, t, g o c

20  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (41)  
<223> n es igual a a, t, g o c

25  
<220>  
<221 > caract\_misc  
<222> (42)  
<223> n es igual a a, t, g o c

30  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (43)  
<223> n es igual a a, t, g o c

35  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (44)  
<223> n es igual a a, t, g o c

40  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (45)  
<223> n es igual a a, t, g o c

45  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (46)  
<223> n es igual a a, t, g o c

50  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (47)  
<223> n es igual a a, t, g o c

55  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (48)  
<223> n es igual a a, t, g o c

60  
<220>  
<221> caract\_misc  
<222> (49)  
<223> n es igual a a, t, g o c

<220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (50)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
 5  
 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (51)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
 10  
 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (52)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
 15  
 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (53)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
 20  
 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (54)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
 25  
 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (55)  
 <223> n es igual a a, t, g o c  
 30  
 <400> 33  
 agtcccacgc atgagcaacc tcactctgtg gtgcacnnn nnnnnnnnn nnnnn 55  
 35  
 <210> 34  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <221> señal  
 <223> Péptido señal de estañocalcina  
 <400> 34  
 Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Leu Leu Val Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Ala  
 45  
 <210> 35  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <221> señal  
 <223> Péptido señal sintético  
 55  
 <400> 35

ES 2 484 966 T3

Met Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15  
 Trp Ala Pro Ala Arg Gly  
 20

<210> 36  
 <211> 733  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 36  
 gggatccgga gcccaaact tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60  
 aattcgaggg tgcaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga 120  
 tctcccggac tcttgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg 180  
 tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 240  
 aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 300  
 ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca accccatcg 360  
 agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 420  
 catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480  
 atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga 540  
 ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg 600  
 acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggetctgc 660  
 acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc 720  
 gactctagag gat 733

10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión de albúmina que comprende (i) factor VII, o un fragmento o una variante del factor VII, fusionado con el extremo N-terminal de la (ii) albúmina humana, o un fragmento o una variante de la albúmina humana, en la que el factor VII o un fragmento o una variante del mismo, tiene actividad biológica de factor VII, de tal forma que, en presencia de factor III e iones de calcio, el factor activado convierte el factor IX en factor IXa y/o el factor X en factor Xa y la variante o el fragmento de albúmina puede estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o el periodo de validez del factor VII en comparación con el factor VII sin fusionar, en la que el factor VII o un fragmento o una variante del mismo es la porción N-terminal de la proteína de fusión y la albúmina humana o un fragmento o una variante de la misma es la porción C-terminal de la proteína de fusión.
- 10 2. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el factor VII es factor VII maduro.
3. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el factor VII es un mutante por delección N-terminal, un mutante por delección C-terminal o un mutante por delección N-terminal y C-terminal del factor VII.
- 15 4. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina, comprende los residuos de aminoácido de 1 a 585 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 1 a 387 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 1 a 194 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 195 a 387 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 388 a 585 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 195 a 585 de la SEC ID NO: 18, o los residuos de aminoácido de 1 a 194 combinados con los residuos de aminoácido de 388 a 585 de la SEC ID NO: 18.
- 20 5. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el factor VII se fusiona con la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina, por medio de un péptido enlazador, preferentemente un enlazador flexible.
- 25 6. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que no está glucosilada.
7. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la proteína de fusión tiene una actividad prolongada *in vivo* en comparación con el factor VII cuando no está fusionado con la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina.
- 30 8. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la proteína de fusión tiene un periodo de validez prolongado en comparación con el factor VII cuando no está fusionado con la albúmina, o un fragmento o una variante de la albúmina.
9. Un medio de cultivo que comprende una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 10. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Una célula huésped que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 que es una célula de mamífero, tal como una célula COS, CHO (de ovario de hámster chino) o NSO.
- 40 13. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 que es una célula de levadura que, opcionalmente, es deficiente en glucosilación y/o deficiente en proteasas y, preferentemente, es *Saccharomyces cerevisiae*.
14. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el polinucleótido tiene los codones optimizados para su expresión en levaduras.
- 45 15. Una célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que la proteína de fusión se secreta de la célula huésped.
16. Un procedimiento para obtener una proteína de fusión de albúmina que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 y purificar la proteína de fusión.
17. Una proteína de fusión de albúmina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en tratamientos.
- 50 18. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de albúmina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.



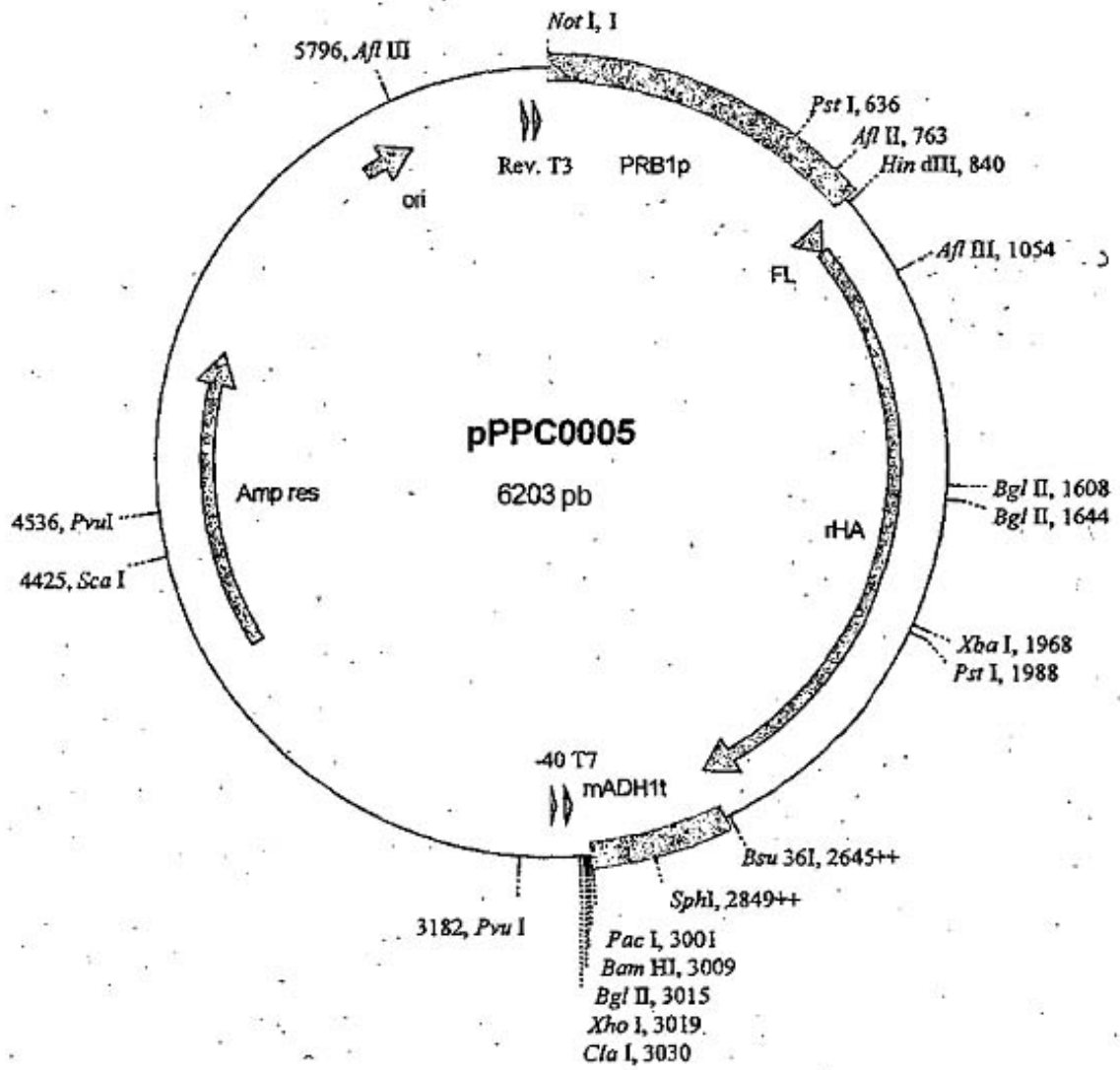


Figura 1

1 GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC AAA 60  
 1 D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K 20  
  
 61 GCC TTG GTG TTG AAT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA 120  
 21 A L V L I A P A Q Y L Q C P F E D H V 40  
  
 121 AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT GAA 180  
 41 K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E 60  
  
 181 AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT 240  
 61 N C D K S L H T L F G D K L C T V A T L 80  
  
 241 CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA 300  
 81 R E T Y G E M A D C C A K Q E P E R N E 100  
  
 301 TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT 360  
 101 C F L Q H K D D N P N L P R L V R P E V 120  
  
 361 GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT 420  
 121 D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y 140  
  
 421 GAA AAT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG 480  
 141 E I A R R H P Y F Y A P E L L F P A K R 160

Figura 2A

481 TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA 540  
 161 Y K A A F T E C C Q A A D K A A C L L P 180

541 AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT 600  
 181 K L D E L R D E G K A S A K Q R L K C 200

601 GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC 660  
 201 A S L Q K F G E R A F K A W A V A R L S 220

661 CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA 720  
 221 Q R F P K A E F A E V S K L V T D L T K 240

721 GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT 780  
 241 V H T E C C H G D L L E C A D D R A D L 260

781 GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA 840  
 261 A K Y I C E N Q D S I S S K L K E C C E 280

841 AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT 900  
 281 K P L L E K S H C I A E V E N D E M P A 300

901 GAC TTG CCT TCA TTA GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT 960  
 301 D L P S L A A D F V E S K D V C K N Y A 320

Figura 2B

961 GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT 1020  
 321 E A K D V F L G M F L Y E Y A R R H P D 340

1021 TAC TCT GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC 1080  
 341 Y S V V L L L R L A K T Y E T L E K C 360

1081 TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT 1140  
 361 C A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L 380

1141 GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG 1200  
 381 V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G E 400

1201 TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT 1260  
 401 Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T 420

1261 CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1320  
 421 P T L V E V S R N L G K V G S K C C K H 440

1321 CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA 1380  
 441 P E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L 460

1381 TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC 1440  
 461 C V L H E K T P V S D R V T K C C T E S 480

Figura 2C

1441 TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA 1500  
 481 L V N R R P C F S A L E V D E T Y V P K 500  
  
 1501 GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG 1560  
 501 E F N A E T F T F H A D I C T L S E K E 520  
  
 1561 AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA 1620  
 521 R Q I K K Q T A L V E L V K H K P K A T 540  
  
 1621 AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG 1680  
 541 K E Q L K A V M D D F A A F V E K C C K 560  
  
 1681 GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA 1740  
 561 A D D K E T C F A E E G K K L V A A S Q 580  
  
 1741 GCT GCC TTA GCC TTA TAA CAT CTA CAT TTA AAA GCA TCT CAG 1782  
 581 A A L G L \* 585

Figura 2D