

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 792**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

**C07K 14/505** (2006.01)

**C07K 14/575** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 38/24** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2007 E 12150722 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2471807**

54 Título: **Polipéptidos de acción prolongada y métodos para producirlos y administrarlos**

30 Prioridad:

**03.02.2006 US 764761 P**

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

**16.09.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 494 792 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Polipéptidos de acción prolongada y métodos para producirlos y administrarlos

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a polipéptidos, y polinucleótidos que los codifican, que comprenden péptidos carboxilo terminales (CTP) de gonadotropina coriónica unidos con un péptido de la hormona del crecimiento. También se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos y polinucleótidos de la invención y usos de los mismos.

**Antecedentes de la invención**

10 Los polipéptidos son susceptibles de desnaturalización o degradación enzimática en la sangre, hígado o riñón. En consecuencia, los polipéptidos típicamente tienen semividas en circulación cortas de varias horas. Debido a su baja estabilidad, los fármacos peptídicos se suministran habitualmente en una frecuencia sostenida para mantener una concentración en plasma eficaz del péptido activo. Además, ya que los fármacos peptídicos se administran habitualmente por infusión, la inyección frecuente de fármacos peptídicos provoca una incomodidad considerable a un sujeto. Por lo tanto, existe la necesidad de tecnologías que prolonguen las semividas de polipéptidos terapéuticos  
15 manteniendo a la vez una alta eficacia farmacológica de los mismos. Dichos fármacos peptídicos deseables también deberían cumplir los requisitos de estabilidad en suero potenciada, alta actividad y una baja probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria indeseada cuando se inyecten a un sujeto.

20 La farmacocinética desfavorable, tal como una semivida en suero corta, puede evitar el desarrollo farmacéutico de muchos candidatos farmacológicos de otro modo prometedores. La semivida en suero es una característica empírica de una molécula, y debe determinarse de forma experimental para cada nuevo fármaco potencial. Por ejemplo, con fármacos polipeptídicos de menor peso molecular, los mecanismos de eliminación fisiológicos tales como filtración renal pueden hacer el mantenimiento de niveles terapéuticos de un fármaco inviable debido al coste o la frecuencia del régimen de dosificación requerido. Por el contrario, una semivida en suero prolongada es indeseable cuando un fármaco o sus metabolitos tienen efectos secundarios tóxicos.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención proporciona un polipéptido que comprende un péptido de interés, en el que se une un primer péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica con el extremo amino terminal de dicho péptido de interés, y se unen un segundo y tercer péptidos carboxilo terminales de gonadotropina coriónica con el extremo carboxilo terminal de dicho péptido de interés, en el que el péptido carboxilo terminal de gonadotropina es de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, en el que dicho péptido de interés es un péptido de la hormona del crecimiento, y en el que dicho péptido de la hormona del crecimiento muestra actividad de la hormona del crecimiento humana (hGH) y es al menos 50 % homólogo de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47.

El péptido de la hormona del crecimiento de interés puede ser glucosilado o no glucosilado.

35 El al menos un péptido carboxilo terminal (CTP) de gonadotropina coriónica puede ser glucosilado.

En una realización, la secuencia del péptido de la hormona del crecimiento puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 39-41.

40 En una realización, la secuencia de al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18.

En una realización, el al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica puede estar truncado, y el péptido carboxilo terminal truncado puede comprender al menos un sitio de glucosilación.

El polipéptido puede comprender además un péptido señal, que puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 19.

45 El al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica puede unirse con el polipéptido de crecimiento mediante un enlazador. En una realización, el enlazador puede ser un enlace peptídico.

50 La invención proporciona además un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención. En diversas realizaciones, la secuencia del polinucleótido puede seleccionarse de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 44-46. El polinucleótido puede codificar un polipéptido que comprende un péptido señal, por ejemplo que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 19.

La invención también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la invención, así como una célula que comprende el vector de expresión.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, el polinucleótido de la invención como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14-17, el vector de expresión de la invención como se describe en la reivindicación 18, o la célula de la invención como se describe en la reivindicación 19, o su combinación.

5 En los ejemplos, los inventores han demostrado aumento del crecimiento en ratas hipofisectomizadas, que no tienen secreción de la hormona del crecimiento, después de inyecciones de CTP-hGH. Por lo tanto, la invención proporciona el uso de un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17 para la preparación de un medicamento para tratar una afección del crecimiento, relacionada con el peso o metabólica. La invención también proporciona un polipéptido de acuerdo con  
10 una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-17 para su uso en el tratamiento de una afección del crecimiento, relacionada con el peso o metabólica.

La invención también proporciona un método para mejorar la semivida biológica y conservar una actividad biológica de un péptido de interés, que comprende la etapa de unir un primer péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica con el extremo amino terminal de dicho péptido de interés y un segundo y tercer péptidos carboxilo  
15 terminales de gonadotropina coriónica con el extremo carboxilo terminal de dicho péptido de interés, mejorando de este modo la semivida biológica de dicho péptido de interés, en el que el CTP es de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, en el que dicho péptido de interés es un péptido de la hormona del crecimiento, en el que dicho péptido de la hormona del crecimiento muestra actividad hGH y es al menos 50 % homólogo de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47. En este método,  
20 la secuencia de al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 17-18.

La invención proporciona además un método para producir un polipéptido de la hormona del crecimiento en una célula aislada, que comprende la etapa de transfectar dicha célula con un vector de expresión que comprende una  
25 parte codificante que codifica un polipéptido, consistiendo dicho polipéptido en un polipéptido de hGH, dos péptidos carboxilo terminales de gonadotropina coriónica unidos con el extremo carboxilo terminal de dicho polipéptido de hGH, y un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica unido con el extremo amino terminal de dicho polipéptido de hGH, en el que el péptido carboxilo terminal de gonadotropina es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, en el que dicho péptido  
30 de la hormona del crecimiento muestra actividad de hGH y es al menos 50 % homólogo de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47, produciendo de este modo un polipéptido de hGH en una célula aislada. En este método, el polipéptido puede comprender un péptido señal, por ejemplo que comprende una secuencia como se expone en SEC ID N°: 19. En este método, el vector de expresión puede comprender una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 44, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 46.

### 35 **Breve descripción de los dibujos**

Las FIGURAS 1A-1F son diagramas que ilustran seis construcciones de EPO-CTP.

La Figura 1A es un diagrama del polipéptido de SEC ID N°: 1

La Figura 1B es un diagrama del polipéptido de SEC ID N°: 2

La Figura 1C es un diagrama del polipéptido de SEC ID N°: 3

40 La Figura 1D es un diagrama del polipéptido de SEC ID N°: 4.

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

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

La FIGURA 2 es una fotografía que ilustra la expresión de las variantes de EPO-CTP de células DG44 transfectadas. Se prepararon muestras de ensayo finales de células transfectadas como se describe bajo  
45 "preparación de muestras" y se procesaron en SDS/PAGE. Las proteínas se detectaron por transferencia de western.

La FIGURA 3 es una gráfica que ilustra la bioactividad *in vivo* de derivados de hEPO recombinantes y EPO-3 (SEC ID N°: 3). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 µg/kg) durante tres semanas de EPO-3, rhEPO-WT (SEC ID N°: 16), Recormon (EPO Comercial) o Recormon (5 µg/kg) 3 veces por semana. Se inyectó IV a los animales de control PBS. Se recogieron muestras sanguíneas tres veces por semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa la media de grupo de hematocrito (%) ± ET.  
50

La FIGURA 4 es una gráfica que ilustra la bioactividad *in vivo* de derivados de hEPO recombinantes y EPO-1 (SEC ID N°: 1). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 µg/kg) durante tres

semanas de EPO-1, rhEPO-WT (SEC ID N°: 16), Recormon o Recormon (5 µg/kg) 3 veces por semana. Se inyectó IV a los animales de control PBS. Se recogieron muestras sanguíneas tres veces por semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa la media del grupo de hematocrito (%) ± ET.

5 La FIGURA 5 es una gráfica que ilustra la bioactividad *in vivo* de derivados de hEPO recombinantes y EPO-2 (SEC ID N°: 2). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 µg/kg) durante tres semanas de EPO-2 (SEC ID N°: 2), rhEPO-WT (SEC ID N°: 16), Recormon o Recormon (5 µg/kg) 3 veces por semana. Se inyectó IV a los animales de control PBS. Se recogieron muestras sanguíneas tres veces por semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa la media del grupo de hematocrito (%) ± ET.

10 La FIGURA 6 es una gráfica temporal que ilustra el cambio en el nivel de reticulocitos después de una única dosis de embolada de EPO-0 (SEC ID N°: 16), EPO-3 (SEC ID N°: 3) y Aranesp.

La FIGURA 7 es una gráfica temporal que ilustra el cambio en el nivel de hemoglobina (presentado como un cambio desde la línea basal) después de una única dosis de embolada de EPO-0 (SEC ID N°: 16), EPO-3 (SEC ID N°: 3) y Aranesp.

15 La FIGURA 8 es una gráfica temporal que ilustra el cambio en el nivel de hematocrito después de una única dosis de embolada de EPO-0 (SEC ID N°: 16), EPO-3 (SEC ID N°: 3) y Aranesp.

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

20 La FIGURA 10 es una transferencia de Western que ilustra el peso molecular y la identidad de MOD-4020 (SEC ID N°: 36), MOD-4021 (SEC ID N°: 37), MOD-4022 (SEC ID N°: 38), MOD-4023 (SEC ID N°: 39) y MOD-4024 (SEC ID N°: 40). El gel de PAGE SDS se transfirió y se tiñó usando anticuerpos monoclonales anti hGH. La fotografía indica que como hGH comercial y de tipo silvestre, las variantes de MOD-7020-4 se reconocen por anticuerpos anti hGH.

25 La FIGURA 11 es una gráfica de barras que ilustra el aumento de peso de ratas hipofisectomizadas después de administración de los polipéptidos de GH-CTP de la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

30 La presente invención describe polipéptidos de la hormona del crecimiento de acción prolongada y métodos para producir y usarlos. Los polipéptidos de acción prolongada comprenden péptidos carboxilo terminal (CTP) de Gonadotropina Coriónica humana (hCG) que actúan como un protector contra la degradación de los polipéptidos de la hormona del crecimiento, extienden la semivida en circulación de los polipéptidos de la hormona del crecimiento y/o mejoran la potencia de los polipéptidos de la hormona del crecimiento.

35 Específicamente, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende un péptido de interés, en el que un primer péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica está unido con el extremo amino terminal de dicho péptido de interés, y un segundo y tercer péptidos carboxilo terminales de gonadotropina coriónica están unidos con el extremo carboxilo terminal de dicho péptido de interés, en el que dicho péptido de interés es un péptido de la hormona del crecimiento, en el que dicho péptido de la hormona del crecimiento muestra actividad hGH y es al menos 50 % homólogo de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47.

40 Las expresiones “péptido CTP”, “péptido carboxilo terminal” y “secuencia de CTP” se usan de forma intercambiable en la presente memoria. En una realización, el péptido carboxilo terminal es un CTP de longitud completa. En otra realización, el péptido carboxilo terminal es un CTP truncado. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Las expresiones “secuencia señal” y “péptido señal” se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

En una realización, “secuencia” cuando se hace referencia a un polinucleótido puede referirse a una parte codificante.

45 Las expresiones “péptido de interés” y “secuencia de interés polipeptídica” se usan de forma intercambiable en la presente memoria. En una realización, el péptido de interés es una proteína de longitud completa. En otra realización, el péptido de interés es un fragmento proteico. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

50 En una realización, el péptido carboxilo terminal (CTP) se une con la secuencia polipeptídica de la hormona del crecimiento de interés mediante un enlazador. En ciertas realizaciones, el enlazador que conecta la secuencia de CTP con la secuencia polipeptídica de interés puede ser un enlace covalente, un enlace peptídico o un enlace peptídico sustituido.

En la presente invención, la frase “secuencia polipeptídica de interés” se refiere a una secuencia de la hormona del crecimiento que muestra actividad hGH y es al menos 50 % homóloga de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47. En una realización, el péptido está glucosilado. En otra realización, el péptido no está glucosilado.

5 Una secuencia de CTP en el extremo amino terminal del polipéptido de la hormona del crecimiento, y dos secuencias de CTP en el extremo carboxilo terminal del polipéptido, proporcionan protección potenciada frente a la degradación de la proteína de la hormona del crecimiento, proporcionan semivida extendida de la proteína de la hormona del crecimiento y/o proporcionan actividad potenciada de la proteína de la hormona del crecimiento.

10 En una realización, el péptido carboxilo terminal (CTP) de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos (AA) de AA 112 a la posición 145 de gonadotropina coriónica humana, como se expone en SEC ID N°: 17. En otra realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende la secuencia de AA de AA 118 a la posición 145 de gonadotropina coriónica humana, como se expone en SEC ID N°: 18. En otra realización, la secuencia de CTP también comienza desde cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 de gonadotropina coriónica humana. En algunas realizaciones, el péptido de la secuencia de CTP es de 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 AA de longitud y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia de AA de CTP.

15 En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 1-5 sustituciones de AA conservativas como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.712.122. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en una sustitución de 1 AA conservativa. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 2 sustituciones de AA conservativas. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 3 sustituciones de AA conservativas. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 4 sustituciones de AA conservativas. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 5 sustituciones de AA conservativas. En otra realización, la secuencia de AA del péptido CTP de la presente invención es al menos 70 % homóloga de la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de AA del péptido CTP de la presente invención es al menos 80 % homóloga de la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de AA del péptido CTP de la presente invención es al menos 90 % homóloga de la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de AA del péptido CTP de la presente invención es al menos 95 % homóloga de la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de la misma.

20 En otra realización, la secuencia de ADN del péptido CTP de la presente invención es al menos 70 % homóloga de la secuencia de ADN del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de ADN del péptido CTP de la presente invención es al menos 80 % homóloga de la secuencia de ADN del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de ADN del péptido CTP de la presente invención es al menos 90 % homóloga de la secuencia de ADN del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de ADN del péptido CTP de la presente invención es al menos 95 % homóloga de la secuencia de ADN del CTP nativo o un péptido de la misma.

25 En otra realización, al menos una de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica está truncada. En otra realización, 2 de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, 2 o más de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, todas las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están truncadas. El CTP comprende los primeros 10 AA de SEC ID N°: 43, es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 11 AA de SEC ID N°: 43. En otra realización, el CTP truncado comprende los 12 AA de SEC ID N°:43, Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

30 En otra realización, al menos una de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica está glucosilada. En otra realización, 2 de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están glucosiladas. En otra realización, 2 o más de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están glucosiladas. En otra realización, todas las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están glucosiladas. En otra realización, la secuencia del CTP de la presente invención comprende al menos un sitio de glucosilación. En otra realización, la secuencia del CTP de la presente invención comprende 2 sitios de glucosilación. En otra realización, la secuencia del CTP de la presente invención comprende 3 sitios de glucosilación. En otra realización, la secuencia del CTP de la presente invención comprende 4 sitios de glucosilación.

35 Aunque no es parte de la invención, puede utilizarse eritropoyetina (EPO) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención como se muestra en los Ejemplos 1-6. La unión de la secuencia de CTP con los extremos tanto amino como carboxilo terminal de la proteína EPO da como resultado aumento de la potencia en la estimulación de eritropoyesis (Figuras 3-5) y (Tabla 5 del Ejemplo 4), en comparación con EPO recombinante y otras combinaciones de EPO y CTP. La EPO unida a tres secuencias de CTP no altera la unión con su receptor como se demuestra en la Tabla 3 del Ejemplo 3 que demuestra que EPO unida con tres secuencias de CTP es igualmente eficaz en la estimulación de la proliferación de células TF-1 que EPO de tipo silvestre. Se exponen polipéptidos EPO-CTP en SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 6. La “eritropoyetina” puede ser eritropoyetina humana, tal como se expone en el N° de

Referencia de GenBank AAA52400.

En algunas realizaciones, se utiliza hormona del crecimiento humana (hGH) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Se demostró que la unión de la secuencia de CTP con los extremos tanto carboxilo como amino terminales de la proteína hGH daba como resultado aumento de la potencia (Figura 11). En algunas realizaciones, la unión de la secuencia de CTP con los extremos tanto amino como carboxilo terminales de la proteína hGH da como resultado actividad *in vivo* prolongada. En una realización, los polipéptidos de CTP-hGH de la presente invención se exponen en SEC ID N°: 39- 41.

En una realización, la frase "hormona del crecimiento humana" (hGH) se refiere a un polipéptido, tal como se expone en el N° de Referencia de Genbank P01241 (SEC ID N°: 47), que muestra actividad hGH (es decir estimulación del crecimiento).

En una realización, la "hormona del crecimiento humana" (hGH) se refiere a un polipéptido, tal como se expone en el N° de Referencia de Genbank P01241, que muestra actividad hGH (es decir estimulación del crecimiento). En una realización, hGH de la presente invención también se refiere a homólogos. En una realización, la secuencia de AA de hGH de la presente invención es al menos 50 % homóloga de una secuencia de hGH expuesta en el N° de Referencia de GenBank P01241 como se determina usando el software BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de hGH de la presente invención es al menos 60 % homóloga de una secuencia de hGH expuesta en el N° de Referencia de GenBank P01241 como se determina usando el software BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de hGH de la presente invención es al menos 70 % homóloga de una secuencia de hGH expuesta en el N° de Referencia de GenBank P01241 como se determina usando el software BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de hGH de la presente invención es al menos 80 % homóloga de una secuencia de hGH expuesta en el N° de Referencia de GenBank P01241 como se determina usando el software BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de hGH de la presente invención es al menos 90 % homóloga de una secuencia de hGH expuesta en el N° de Referencia de GenBank P01241 como se determina usando el software BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de hGH de la presente invención es al menos 95 % homóloga de una secuencia de hGH expuesta en el N° de Referencia de GenBank P01241 como se determina usando el software BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) usando parámetros por defecto.

Se exponen polipéptidos CTP-hGH ejemplares de la presente invención en SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 40 y SEC ID N°: 41.

En una realización, la presente invención proporciona un péptido hGH que tiene un péptido de AA de CTP en el extremo N terminal y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C terminal para la preparación de un medicamento para tratar una afección del crecimiento, relacionada con el peso o metabólica. El medicamento puede actuar estimulando el crecimiento muscular, estimulando el crecimiento óseo, aumentando la función cardíaca, aumentando la lipólisis, mejorando el equilibrio de fluidos, mejorando la función pulmonar, mejorando la inmunidad o restaurando el sueño REM. El medicamento puede usarse, por ejemplo, para tratar una enfermedad de debilitamiento o caquexia, tratar o inhibir la osteoporosis, tratar el SIDA, tratar la deficiencia de hGH, así como otras afecciones como se analiza posteriormente. En algunas realizaciones, el péptido hGH puede tener la secuencia expuesta en SEC ID N°: 23, en SEC ID N°: 36, en SEC ID N°: 37, en SEC ID N°: 38, en SEC ID N°: 39, en SEC ID N°: 40, en SEC ID N°: 41, en SEC ID N°: 42 o en SEC ID N°: 44.

En otra realización, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de hGH que tiene un péptido de AA de CTP en el extremo N terminal y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C terminal para la preparación de un medicamento para tratar una afección del crecimiento, relacionada con el peso o metabólica. El medicamento puede actuar estimulando el crecimiento muscular, estimulando el crecimiento óseo, aumentando la función cardíaca, aumentando la lipólisis, mejorando el equilibrio de fluidos, mejorando la función pulmonar, mejorando la inmunidad o restaurando el sueño REM. El medicamento puede usarse, por ejemplo, para tratar una enfermedad de debilitamiento o caquexia, tratar o inhibir la osteoporosis, tratar el SIDA, tratar la deficiencia de hGH, así como tratar otras afecciones como se analiza posteriormente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede tener la secuencia de SEC ID N°: 45 o SEC ID N°: 46 que codifica un péptido de hGH que comprende un péptido de AA de CTP en el extremo N terminal y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C terminal.

En algunas realizaciones, la homología de acuerdo con la presente invención también abarca deleciones, inserciones o variantes de sustitución, incluyendo una sustitución de AA, de las mismas y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de las mismas. En una realización la variante de sustitución es una en la que la glutamina en la posición 65 de hGH se sustituye por una valina (SEC ID N°: 23) [Gellerfors *et al.*, J Pharm Biomed Anal 1989, 7: 173-83].

- 5 En una realización, la invención se emplea en medicina veterinaria. En una realización, la presente invención proporciona medicamentos para el tratamiento de mamíferos domesticados que se mantienen como compañeros humanos (por ejemplo, perros, gatos, caballos), que tienen valor comercial significativo (por ejemplo, vacas lecheras, ganado de carne, animales deportivos), que tienen valor científico significativo (por ejemplo, especímenes cautivos o libres de especies en peligro de extinción), o que tienen valor de otro modo.
- 10 En una realización, pueden administrarse polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención a un animal (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, cobaya, cerdos, cerdo enano, pollo, camello, cabra, caballo, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano y ser humano. En una realización, las aplicaciones enumeradas tienen usos en una amplia diversidad de hospedadores. En algunas realizaciones, dichos hospedadores incluyen, pero sin limitación, ser humano, murino, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, ratón, rata, hámster, cerdo, cerdo enano, pollo, cabra, vaca, oveja, perro, gato o primate no humano.
- 15 En una realización, se tratan animales de granja con los medicamentos de la presente invención. En una realización, los animales de granja incluyen cerdos, vacas, vacas lecheras, caballos, cabras, ovejas, pollos, pavos, gansos, patos y especies relacionadas. En una realización, se tratan animales de laboratorio por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales de laboratorio incluyen ratas, ratones, cobayas, conejos, cabras, monos, perros, gatos y otros. En una realización, se tratan animales de zoológico por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales de zoológico incluyen todos los animales vertebrados mantenidos en zoológicos. En una realización, se tratan animales acuáticos por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales acuáticos incluyen peces, anguilas, tortugas, focas, pingüinos, tiburones, ballenas y especies relacionadas.
- 20 En una realización, se tratan animales domesticados por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales domesticados incluyen cualquier mascota, tal como perros y gatos, o animal que se mantiene por seres humanos, por ejemplo, caballos, vacas, cerdos, cabras, conejos, pollos, pavos, gansos, patos y similares.
- 25 De acuerdo con la presente invención el término cerdos incluye cerdos, lechones, puercos, lechonas, cerdos castrados jóvenes, jabalíes y cerdas. En otra realización, "ganado bovino" se refiere a terneros, vacas, vacas lecheras, vaquillas, novillos y toros.
- 30 En una realización, se utiliza hormona del crecimiento bovina por los métodos de la presente invención. En una realización, la hormona del crecimiento bovina artificial se utiliza por los métodos de la presente invención. En una realización, la hormona del crecimiento bovina artificial tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número AAA72262. En otra realización, la hormona del crecimiento bovina artificial es cualquier otra hormona del crecimiento bovina artificial conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 35 En una realización, se utiliza hormona del crecimiento de ovejas por los métodos de la presente invención. En una realización, la hormona del crecimiento de ovejas tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número NP\_001009315. En otra realización, la hormona del crecimiento de ovejas es cualquier otra hormona del crecimiento de ovejas conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 40 En una realización, se utiliza hormona del crecimiento de caballo por los métodos de la presente invención. En una realización, la hormona del crecimiento de caballo tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número AAA21027. En otra realización, La hormona del crecimiento de caballo es cualquier otra hormona del crecimiento de caballo conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 45 En una realización, se utiliza hormona del crecimiento de pollo por los métodos de la presente invención. En una realización, la hormona del crecimiento de pollo tiene la secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número CAA3561. En otra realización, La hormona del crecimiento de pollo es cualquier otra hormona del crecimiento de pollo conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 50 En una realización, se utiliza hormona del crecimiento de tilapia por los métodos de la presente invención. En una realización, la hormona del crecimiento de tilapia tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número CAA00818. En otra realización, La hormona del crecimiento de tilapia es cualquier otra hormona del crecimiento de tilapia conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 55 En algunas realizaciones, la modificación de secuencia de CTP es ventajosa para permitir usar dosificaciones menores.
- En algunas realizaciones, "polipéptido" como se usa en la presente memoria abarca polipéptidos nativos (productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o bien polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos

polipeptídicos, que tienen, en algunas realizaciones, modificaciones que hacen a los polipéptidos aún más estables cuando están en un cuerpo o más capaces de penetrar en células.

En algunas realizaciones, las modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificación del extremo N terminal, modificación del extremo C terminal, modificación de enlaces polipeptídicos, incluyendo, pero sin limitación, CH<sub>2</sub>-NH, CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>-S=O, O=C-NH, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de cadena principal y modificación de restos. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar compuestos peptidomiméticos y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Se proporcionan posteriormente en la presente memoria más detalles a este respecto.

En algunas realizaciones, se sustituyen enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido. En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces N-metilados (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces éster (-C(R)H-C-O-C(R)-N-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de cetometileno (-CO-CH<sub>2</sub>-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces  $\alpha$ -aza (-NH-N(R)-CO-), en los que R es cualquier enlace carba alquilo, por ejemplo, metilo, (-CH<sub>2</sub>-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de hidroxietileno (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de tioamida (-CS-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de retro amida (-NH-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por derivados polipeptídicos (-N(R)-CH<sub>2</sub>-CO-), en los que R es la cadena lateral "normal" presentada de forma natural en el átomo de carbono. En algunas realizaciones, estas modificaciones se producen en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varios (2-3 enlaces) al mismo tiempo.

En algunas realizaciones, se sustituyen con AA aromáticos naturales del polipéptido tales como Trp, Tyr y Phe ácidos no naturales sintéticos tales como Fenilglicina, TIC, naftilalanina (Nol), derivados metilados anulares de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más AA modificados o uno o más monómeros no AA (por ejemplo ácido graso, carbohidratos complejos, etc.).

En una realización, se entiende que "AA" incluye los 20 AA de origen natural; los AA con frecuencia modificados postraducionalmente *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros AA poco habituales incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. En una realización, "AA" incluye tanto D como L-AA.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en productos terapéuticos que requieren que los polipéptidos estén en una forma soluble. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más AA polares no naturales o naturales, incluyendo pero sin limitación serina y treonina que son capaces de aumentar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en una forma lineal, aunque se apreciará por un experto en la materia que en casos en los que la ciclación no interfiera gravemente con las características del polipéptido, también pueden utilizarse formas cíclicas del polipéptido.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se sintetizan de forma bioquímica tal como usando técnicas de fase sólida convencionales. En algunas realizaciones, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis de fase sólida exclusiva, síntesis de fase sólida parcial, condensación de fragmentos, o síntesis de solución clásica. En algunas realizaciones, estos métodos se usan cuando el polipéptido es relativamente corto (aproximadamente 5-15 kDa) y/o cuando no puede producirse por técnicas recombinantes (es decir, no está codificado por una secuencia de ácido nucleico) y por lo tanto implica química diferente.

También se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos de síntesis de polipéptidos de fase sólida y se describe adicionalmente en John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2<sup>a</sup> Ed., Pierce Chemical Company, 1984). En algunas realizaciones, los polipéptidos sintéticos se purifican por cromatografía líquida de alto rendimiento preparatoria [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N. Y.] y cuya composición puede confirmarse mediante secuenciación de AA por métodos conocidos por los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para generar los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, mayores de 18-25 AA). En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de grandes cantidades del polipéptido de la presente invención. Se describen técnicas recombinantes en Bitter *et al.*, (1987) Methods in Enzymol. 153: 516-544, Studier *et al.* (1990) Methods in Enzymol. 185: 60-89, Brisson *et al.* (1984) Nature 310: 511-514, Takamatsu *et al.* (1987) EMBO J. 6: 307-311, Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3: 1671-1680 y Brogli *et al.*, (1984) Science 224: 838-843, Gurley *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 559-565 y Weissbach y Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pp 421-463.

En una realización, un polipéptido de la presente invención se sintetiza usando un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se liga en un vector de expresión que comprende un control de la transcripción de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, secuencia promotora). En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva del polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión específica de tejido del polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión inducible del polipéptido de la presente invención.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos que expresan los polipéptidos de la presente invención son como se exponen en SEC ID N°: 44, 45 y 46.

Los promotores específicos de tejido adecuados para su uso con la presente invención incluyen secuencias que son funcionales en poblaciones celulares específicas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, promotores tales como albúmina que es específica de hígado [Pinkert *et al.*, (1987) Genes Dev. 1: 268-277], promotores específicos linfoides [Calame *et al.*, (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275]; en particular promotores de los receptores de linfocitos T [Winoto *et al.*, (1989) EMBO J. 8: 729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji *et al.* (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de neuronas tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlunch *et al.* (1985) Science 230: 912-916] o promotores específicos de glándula mamaria tales como el promotor de suero de la leche (Patente de Estados Unidos N° 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea N° 264.166). Los promotores inducibles adecuados para su uso con la presente invención incluyen por ejemplo el promotor inducible por tetraciclina (Srour, M. A., *et al.*, 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405).

La frase "un polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico mono o bicatenaria que puede aislarse y proporcionarse en forma de una secuencia de ARN, una secuencia polinucleotídica complementaria (ADNc), una secuencia polinucleotídica genómica y/o una secuencia polinucleotídica compuesta (por ejemplo, una combinación de las anteriores).

La frase "secuencia polinucleotídica complementaria" se refiere a una secuencia, que resulta de la transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. En una realización, la secuencia puede amplificarse posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa.

La frase "secuencia polinucleotídica genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y por lo tanto representa una parte contigua de un cromosoma.

La frase "secuencia polinucleotídica compuesta" se refiere a una secuencia que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una realización, una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre ellas. En una realización, las secuencias intrónicas puede ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal de corte y empalme conservadas. En una realización, las secuencias intrónicas incluyen elementos reguladores de expresión de acción en cis.

En una realización, los polinucleótidos de la presente invención comprenden además una secuencia señal que codifica un péptido señal para la secreción de los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, las secuencias señal incluyen, pero sin limitación la secuencia señal endógena para EPO como se expone en SEC ID N°: 19 o la secuencia señal endógena para IFN- $\beta$ 1 como se expone en SEC ID N°: 26. En otra realización, la secuencia señal está N terminal de la secuencia de CTP que está a su vez N terminal de la secuencia polipeptídica de interés de la hormona del crecimiento; por ejemplo, la secuencia es (a) secuencia señal, (b) CTP, (c) secuencia de interés de hormona del crecimiento, (d) 2 o más secuencias de CTP adicionales. En otra realización, se insertan 1 o más secuencias de CTP entre la secuencia señal de una secuencia polipeptídica de interés y la secuencia polipeptídica de interés en sí misma, interrumpiendo de este modo la secuencia de tipo silvestre de interés. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En una realización, después de expresión y secreción, los péptidos señal se escinden de las proteínas precursoras dando como resultado las proteínas maduras.

En algunas realizaciones, se preparan polinucleótidos de la presente invención usando técnicas de PCR como se describe en el Ejemplo 1, o cualquier otro método o procedimiento conocido por un experto en la materia. En algunas realizaciones, el procedimiento implica el ligamiento de dos secuencias de ADN diferentes (Véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons, 1992).

En una realización, se insertan polinucleótidos de la presente invención en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para replicación e integración en procariotas. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para replicación e integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye un vector lanzadera que hace a este vector

adecuado para replicación e integración tanto en procariotas como en eucariotas. En algunas realizaciones, los vectores de clonación comprenden secuencias de inicio de la transcripción y traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

5 Puede usarse una diversidad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión hospedadores para expresar los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vector de expresión de ADN cosmídico que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de polipéptidos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante, tales como plásmido Ti, que contienen la secuencia codificante del polipéptido.

10 En algunas realizaciones, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo sistemas de expresión de mamíferos tales como células CHO) para expresar el polipéptido de la presente invención. En una realización, el vector de expresión usado para expresar polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a neomicina. Se describe la construcción del vector pCI-dhfr, de acuerdo con una realización, en el Ejemplo 1.

15 En algunas realizaciones, en sistemas bacterianos de la presente invención, pueden seleccionarse provechosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. En una realización, se desean grandes cantidades de polipéptido. En una realización, se desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado al periplasma de la bacteria o el medio de cultivo en el que el producto proteico se purifica fácilmente. En una realización, ciertas proteínas de fusión se modifican por ingeniería genética con un sitio de escisión específico para ayudar en la recuperación del polipéptido. En una realización, los vectores adaptables a dicha manipulación incluyen, pero sin limitación, la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier *et al.*, Methods in Enzymol. 185: 60-89 (1990)].

20 En una realización, se usan sistemas de expresión de levaduras. En una realización, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles en levadura como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 5.932.447. En otra realización, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN ajeno en el cromosoma de levadura.

30 En una realización, el vector de expresión de la presente invención puede incluir además secuencias polinucleotídicas adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas de un único ARNm tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y secuencias para la integración genómica del polipéptido químico del promotor.

35 En algunas realizaciones, los vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Strategene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

40 En algunas realizaciones, se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus por la presente invención. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas realizaciones, los vectores derivados de virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Barr incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMT010/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus y cualquier otro vector que permite la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se ha mostrado que son eficaces para la expresión en células eucariotas.

45 En algunas realizaciones, son útiles vectores virales recombinantes para expresión *in vivo* de los polipéptidos de la presente invención ya que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de dirección. En una realización, la infección lateral es inherente en el ciclo de vida de, por ejemplo, retrovirus y es el proceso por el que una única célula infectada produce muchos viriones descendientes que emergen e infectan células vecinas. En una realización, el resultado es que se infecta rápidamente un área grande, la mayor parte de la cual no se había infectado inicialmente por las partículas virales originales. En una realización, se producen vectores virales que son incapaces de propagarse lateralmente. En una realización, esta característica puede ser útil si el fin deseado es introducir un gen específico solamente en un número localizado de células diana.

55 Pueden usarse diversos métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención en células. Dichos métodos se describen en general en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang *et al.*, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega *et al.*,

Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa *et al.* [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores virales recombinantes. Además, véase Patentes de Estados Unidos N° 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positivos-negativos.

En algunas realizaciones, la introducción de ácido nucleico por infección viral ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como lipofección y electroporación, ya que puede obtenerse mayor eficacia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

En una realización, se apreciará que los polipéptidos de la presente invención también pueden expresarse a partir de una construcción de ácido nucleico administrada al individuo que emplea cualquier modo adecuado de administración, descrita en la presente memoria (es decir, terapia génica *in vivo*). En una realización, se introduce la construcción de ácido nucleico en una célula adecuada mediante un vehículo/método de suministro génico apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario y después se expanden las células modificadas en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica *ex vivo*).

Se ha intentado la terapia génica *in vivo* usando EPO en modelos animales tales como roedores [Bohl *et al.*, Blood. 2000; 95:2793-2798], primates [Gao *et al.*, Blood, 2004, Volumen 103, Número 9] y ha sido exitosa en ensayos clínicos humanos para pacientes con insuficiencia renal crónica [Lippin *et al.* Blood 2005, 106, Número 7].

En una realización, se usan vectores de expresión vegetales. En una realización, la expresión de una secuencia codificante del polipéptido se conduce por varios promotores. En algunas realizaciones, se usan promotores virales tales como los promotores de ARN 35S y ARN 19S de CaMV [Brisson *et al.*, Nature 310: 511-514 (1984)], o el promotor de proteína de cubierta para TMV [Takamatsu *et al.*, EMBO J. 6: 307-311 (1987)]. En otra realización, se usan promotores vegetales tales como, por ejemplo, la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi *et al.*, EMBO J. 3: 1671-1680 (1984); y Brogli *et al.*, Science 224: 838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja [Gurley *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6: 559-565 (1986)]. En una realización, se introducen construcciones en células vegetales usando plásmido Ti, plásmido Ri, vectores virales de plantas, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Weissbach y Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, pp 421-463 (1988)]. También pueden usarse por la presente invención otros sistemas de expresión tales como sistemas celulares hospedadores de insectos y mamíferos, que se conocen bien en la técnica.

Se apreciará que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de las secuencias codificantes insertadas (que codifican el polipéptido), la construcción de expresión de la presente invención también puede incluir secuencias modificadas por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado.

Pueden usarse diversos métodos, en algunas realizaciones, para introducir el vector de expresión de la presente invención en el sistema celular hospedador. En algunas realizaciones, dichos métodos se describen en general en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang *et al.*, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega *et al.*, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa *et al.* [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores virales recombinantes. Además, véase Patentes de Estados Unidos N° 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positivos-negativos.

En algunas realizaciones, se cultivan células transformadas en condiciones eficaces, que permiten la expresión de altas cantidades de polipéptido recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin limitación, medio eficaz, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de proteínas. En una realización, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. En algunas realizaciones, un medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas, apropiados. En algunas realizaciones, pueden cultivarse células de la presente invención en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de petri. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto habitual en la técnica.

En algunas realizaciones, dependiendo del vector y sistema hospedador usado para la producción, los polipéptidos resultantes de la presente invención permanecen dentro de la célula recombinante, se secretan al medio de fermentación, se secretan a un espacio entre dos membrana celulares, tales como el espacio periplásmico en *E. coli*; o se conservan en la superficie externa de una membrana celular o viral.

En una realización, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa recuperación del polipéptido recombinante.

5 En una realización, la frase “recuperar el polipéptido recombinante” usada en la presente memoria se refiere a recoger el medio de fermentación completo que contiene polipéptido y no es necesario que implique etapas adicionales de separación o purificación.

En una realización, se purifican polipéptidos de la presente invención usando una diversidad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatoenfoque y solubilización diferencial.

10 En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse por ingeniería genética para codificar el polipéptido de la presente invención y resto escindible fusionado. En una realización, puede diseñarse una proteína de fusión de modo que el polipéptido pueda aislarse fácilmente por cromatografía de afinidad; por ejemplo, por inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una realización, se introduce por ingeniería genética un sitio de escisión entre el polipéptido y el resto escindible y el  
15 polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [por ejemplo, véase Booth *et al.*, Immunol. Lett. 19: 65-70 (1988); y Gardella *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 15854-15859 (1990)].

En una realización, el polipéptido de la presente invención se recupera en forma “sustancialmente pura”.

20 En una realización, la frase “sustancialmente pura” se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en la presente memoria.

En una realización, el polipéptido de la presente invención también puede sintetizarse usando sistemas de expresión *in vitro*. En una realización, se conocen bien en la técnica métodos de síntesis *in vitro* y están disponibles en el mercado los componentes del sistema.

La producción de polipéptidos CTP-EPO-CTP usando tecnología de ADN recombinante se ilustra en el Ejemplo 1.

25 En algunas realizaciones, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y se purifican; su eficacia terapéutica puede ensayarse bien *in vivo* o bien *in vitro*. Como ejemplo, las actividades de unión de polipéptidos de CTP-EPO recombinantes pueden determinarse usando diversos ensayos como se describe en los Ejemplos. Por ejemplo, la actividad de unión *in vitro* puede determinarse midiendo la capacidad del polipéptido para estimular la proliferación de células TF-1, y la actividad *in vivo* puede deducirse analizando los niveles de hematocrito (Figuras 3-5) y/o como un porcentaje de reticulocitos.  
30

En una realización, la presente invención comprende polipéptidos CTP-hGH-CTP. En una realización, se usan métodos de tecnología de ADN recombinante para la producción de polipéptidos CTP-hGH-CTP como se ilustra en el Ejemplo 7. En una realización, la eficacia terapéutica de los polipéptidos CTP-hGH-CTP de la presente invención se ensaya *in vivo*. En una realización, la eficacia terapéutica de los polipéptidos CTP-hGH-CTP de la presente  
35 invención se ensaya *in vitro*. En una realización, las actividades de unión de los polipéptidos de hGH recombinantes de la presente invención se miden usando Nb2 (una línea celular del linfoma de rata dependiente de prolactina (Banco de Células ECACC)) o una línea celular murina FCD-P1, previamente transfectada con receptor de la hormona del crecimiento humana. En una realización, la unión de hGH con estos receptores induce la proliferación celular que en una realización se mide por los niveles de tinción celular de MTT en función de la actividad de hGH.  
40 En una realización, la actividad *in vivo* se deduce midiendo el aumento de peso a lo largo del tiempo en animales deficientes en hormona del crecimiento tratados.

En algunas realizaciones, la invención proporciona polipéptidos de la hormona del crecimiento humana-CTP de la presente invención para el tratamiento de un sujeto, con afecciones relacionadas con el crecimiento y el peso, tales como trastorno de deficiencia del crecimiento, debilitamiento por SIDA, envejecimiento, función inmunitaria  
45 deteriorada de sujetos infectados por VIH, una enfermedad catabólica, recuperación quirúrgica, una cardiomiopatía congestiva, trasplantes de hígado, regeneración de hígado después de hepatectomía, insuficiencia renal crónica, osteodistrofia renal, osteoporosis, acondroplasia/hipocondroplasia, displasia esquelética, un trastorno inflamatorio crónico o nutricional tal como enfermedad de Crohn, síndrome del intestino corto, artritis crónica juvenil, fibrosis quística, infertilidad masculina, raquitismo hipofosfatémico ligado a X, síndrome de Down, espina bífida, Síndrome de Noonan, obesidad, fuerza muscular deteriorada y fibromialgia.  
50

En una realización, los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo por sí solos. En una realización, los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica cuando se mezclan con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 En una realización, una “composición farmacéutica” se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a

un organismo.

En una realización, “principio activo” se refiere a la secuencia polipeptídica de interés, que causa el efecto biológico.

5 En una realización, la presente invención proporciona preparaciones combinadas. En una realización, “una preparación combinada” define especialmente un “kit de partes” en el sentido de que los compañeros de combinación como se han definido anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los compañeros de combinación es decir, simultáneamente, conjuntamente, por separado o secuencialmente. En algunas realizaciones, las partes del kit de partes pueden después, por ejemplo, administrarse de forma simultánea o escalonarse cronológicamente, es decir en diferentes puntos temporales y con intervalos temporales iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. La relación de las cantidades totales de los compañeros de combinación, en algunas realizaciones, puede administrarse en la preparación combinada. En una realización, la preparación combinada puede variarse, por ejemplo, para afrontar las necesidades de una subpoblación de pacientes para tratar o las necesidades del paciente individual cuyas necesidades diferentes pueden deberse a una enfermedad particular, gravedad de una enfermedad, edad, sexo o peso corporal como puede realizarse fácilmente por un experto en la materia.

15 En una realización, las frases “vehículo fisiológicamente aceptable” y “vehículo farmacéuticamente aceptable” que pueden usarse de forma intercambiable se refieren a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases. En una realización, uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto acuosos como orgánicos (Mutter *et al.* (1979)).

20 En una realización, “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. En una realización, los excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

25 Se encuentran técnicas para formulación y administración de fármacos en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

En una realización, las vías adecuadas de administración, por ejemplo, incluyen suministro oral, rectal, transmucoso, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

30 En una realización, la preparación o medicamento es para administrar de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

Se contemplan diversas realizaciones de intervalos de dosificación por la presente invención. La dosificación del polipéptido de la presente invención, en una realización, está en el intervalo de 0,05-80 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,05-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-20 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,1-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,5-5 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 0,5-50 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 5-80 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 35-65 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 20-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 45-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 60-120 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 120-240 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 240-400 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 45-60 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 15-25 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de 55-65 mg/día.

50 En una realización, la dosificación es de 20 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 30 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 40 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 50 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 60 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 70 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 80 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 90 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 100 mg/día.

55 La administración oral, en una realización, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende comprimidos, cápsulas, grageas, comprimidos masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Dichas formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y eficaz del compuesto, o los compuestos, deseados cada uno de los cuales está en una realización, de aproximadamente 0,7 o 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra realización, de aproximadamente 0,5 o 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de formas de dosificación unitarias para

administración peroral se conocen bien en la técnica. En algunas realizaciones, los comprimidos típicamente comprenden adyuvantes convencionales farmacéuticamente compatibles como diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes tales como almidón, gelatina y sacarosa; disgregantes tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una realización, pueden usarse emolientes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla de polvos. En una realización, pueden añadirse agentes colorantes, tales como colorantes FD y C, para la apariencia. Los edulcorantes y agentes saporíferos, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y sabores de frutas, son adyuvantes útiles para comprimidos masticables. Las cápsulas típicamente comprenden uno o más diluyentes sólidos desvelados posteriormente. En algunas realizaciones, la selección de componentes vehículo depende de consideraciones secundarias como el sabor, el coste y la estabilidad en almacenamiento, que no son críticas para los fines de la presente invención, y puede realizarse fácilmente por un experto en la materia.

En una realización, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación extendida. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación lenta. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación inmediata. En una realización, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el perfil de liberación deseado del principio activo farmacéutico como se conoce por los expertos en la materia.

Las composiciones perorales, en algunas realizaciones, comprenden soluciones, emulsiones, suspensiones líquidas y similares. En algunas realizaciones, se conocen bien en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de dichas composiciones. En algunas realizaciones, las composiciones orales líquidas comprenden de aproximadamente el 0,012 % a aproximadamente el 0,933 % del compuesto o los compuestos deseados, o en otra realización, de aproximadamente el 0,033 % a aproximadamente el 0,7%.

En algunas realizaciones, las composiciones para su uso en los métodos de la presente invención comprenden soluciones o emulsiones, que en algunas realizaciones son soluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos de la presente invención y opcionalmente otros compuestos, pretendidos para administración intranasal tópica. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 10,0 % p/v de un compuesto objeto, más preferentemente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,0 %, que se usa para suministro sistémico de los compuestos por la vía intranasal.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas van a administrarse por inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una realización, las composiciones farmacéuticas van a administrarse por vía intravenosa, y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas van a administrarse por vía intraarterial, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas van a administrarse por vía intramuscular y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para administración intramuscular.

Además, en otra realización, las composiciones farmacéuticas van a administrarse por vía tópica a superficies corporales, y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para administración tópica, los compuestos de la presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos apropiados adicionales, preparados y aplicados como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, realización de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

En una realización, las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se formulan de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden usarse de forma farmacéutica. En una realización, la formulación depende de la vía de administración seleccionada.

En una realización, se formulan inyectables de la invención en soluciones acuosas. En una realización, se formulan inyectables de la invención en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. En algunas realizaciones, para administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera para permear en la formulación. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

En una realización, las preparaciones descritas en la presente memoria se formulan para administración parenteral, por ejemplo, por inyección de embolada o infusión continua. En algunas realizaciones, se presentan formulaciones

para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. En algunas realizaciones, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículo oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o de dispersión.

- 5 Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como edetato sódico y otros; tampones tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad tales como cloruro sódico, cloruro potásico, glicerina, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfato sódico y otros; agentes aromáticos; agentes de ajuste de viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de la misma; y alcohol polivinílico y ácido y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según se necesite. Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, anestesia local u otros activos. Las composiciones pueden usarse como pulverizaciones, nebulizaciones, gotas y similares.

- 10 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, se preparan suspensiones de los principios activos, en algunas realizaciones, como suspensiones de inyección basadas en agua u oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados, incluyen, en algunas realizaciones, aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como etiloleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa contienen, en algunas realizaciones, sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. En otra realización, la suspensión también contiene estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

- 15 En otra realización, el compuesto activo puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase 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, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, misma referencia., pp. 317-327; véase en general la misma referencia).

- 20 En otra realización, la composición farmacéutica suministrada en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se usa una bomba (véase Langer, mencionado 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)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos. En otra realización más, puede situarse un sistema de liberación controlada en proximidad a la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, mencionado anteriormente, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

- 25 En algunas realizaciones, el principio activo está en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución basada en agua sin pirógenos, estéril, antes de su uso. Las composiciones se formulan, en algunas realizaciones, para administración por atomización e inhalación. En otra realización, las composiciones están contenidas en un recipiente con medios de atomización unidos.

- 30 En una realización, la preparación de la presente invención se formula en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 35 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se trate.

40 En una realización, la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

- 45 Las composiciones también comprenden conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como edetato sódico y otros; tampones tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad tales como cloruro sódico, cloruro potásico, glicerina, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetil cistina, metabisulfato sódico y otros; agentes aromáticos; agentes de ajuste de la viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de la misma; y alcohol polivinílico y ácidos y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según se necesite. Las composiciones también comprenden anestesia local u otros activos. La composición puede usarse como pulverizaciones, nebulizaciones, gotas y similares.

50 Algunos ejemplos de sustancias que pueden actuar como vehículos farmacéuticamente aceptables o componentes de los mismos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y metil celulosa;

tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tales como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato cálcico; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico; emulsionantes tales como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tales como lauril sulfato sódico; agentes colorantes; agentes saporíferos; agentes de formación de comprimidos, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; y soluciones de tampón fosfato. La elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar junto con el compuesto se determina básicamente por el modo en que va a administrarse el compuesto. Si el compuesto objeto se va a inyectar, en una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH se ha ajustado a aproximadamente 7,4.

Además, las composiciones comprenden adicionalmente aglutinantes (por ejemplo, goma arábica, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etil celulosa, goma guar, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón sódico), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo lauril sulfato sódico), potenciadores de la permeación, agentes de solubilización (por ejemplo, glicerol, polietilén glicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizadores (por ejemplo hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo carbómero, dióxido de silicio coloidal, etil celulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato sódico), ayuda de fluidificación (por ejemplo dióxido de silicio coloidal), plastificadores (por ejemplo dietil ftalato, trietil citrato), emulsionantes (por ejemplo carbómero, hidroxipropil celulosa, lauril sulfato sódico), revestimientos poliméricos (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes formadores de revestimientos y películas (por ejemplo, etil celulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

Los componentes típicos de vehículos para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, celulosa (por ejemplo, Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato sódico; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y polioxietilén sorbitán (por ejemplo polisorbato 80). Los conservantes típicos incluyen metil parabeno y benzoato sódico. En otra realización, las composiciones líquidas perorales también contienen uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes saporíferos y colorantes desvelados anteriormente.

Las composiciones también incluyen la incorporación del material activo en o sobre preparaciones de partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos, o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo*.

También se comprenden por la invención composiciones en partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado con anticuerpos dirigido contra receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplado con ligandos de receptores específicos de tejido.

En algunas realizaciones, compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona o poliprolina. En otra realización, los compuestos modificados muestran semividas sustancialmente más prolongadas en sangre después de inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes. En una realización, las modificaciones también aumentan la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminan la agregación, potencian la estabilidad física y química del compuesto y reducen en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra realización, la actividad biológica deseada *in vivo* se consigue por la administración de dichos aductos de polímero-compuesto menos frecuentemente o en menores dosis que con el compuesto no modificado.

En algunas realizaciones, puede estimarse la preparación de la cantidad o dosis eficaz inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. En una realización, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos.

En una realización, pueden determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en la presente memoria por procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una realización, los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular e *in vitro* y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. En una realización, las dosificaciones varían dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. En una realización, la formulación, vía de administración y dosificación exactas pueden seleccionarse por el médico individual a la vista de la condición del paciente [Véase, por ejemplo, Fingl, *et al.*, (1975) "The

Pharmacological Basis of Therapeutics”, C. 1 p.1].

En una realización, dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección para tratar, la dosificación puede ser de una única o una pluralidad de administraciones, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la cura o se consigue disminución de la patología.

- 5 En una realización, la cantidad de una composición para administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trate, la gravedad de la afección, la manera de administración, el criterio del médico que la prescribe, etc.

En una realización, también se preparan composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, se colocan en un recipiente apropiado y se marcan para el tratamiento de una afección indicada.

- 10 En una realización, las composiciones de la presente invención se presentan en un envase o dispositivo dosificador, tal como un kit aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. En una realización, el envase, por ejemplo, comprende papel metálico o plástico, tal como un envase de blíster. En una realización, el envase o dispositivo dosificador se acompaña de instrucciones para la administración. En una realización, el envase o dosificador se acompaña de un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, siendo dicho aviso reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Dicho aviso, en una realización, es una etiqueta aprobada por la administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos para fármacos de prescripción o de un prospecto de producto aprobado.

- 20 En una realización, se apreciará que los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para conseguir un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada agente por sí solo. En otra realización, se toman medidas (por ejemplo, dosificación y selección del agente complementario) para efectos secundarios adversos que se asocian con terapias de combinación.

- 25 Resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica objetos, ventajas y características nuevas adicionales de la presente invención tras la examinación de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han indicado anteriormente en la presente memoria y como se reivindican en la sección de reivindicaciones posteriormente encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

- 30 Los ejemplos 1-6 son ejemplos comparativos que ilustran las ventajas de la presente invención en relación con EPO.

- En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook *et al.*, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique” de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; “Current Protocols in Immunology” Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) and “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996). Se proporcionan en todo este documento otras referencias generales.

**EJEMPLO 1****Generación de construcciones de EPO****Materiales y métodos:**

**Construcción del vector de expresión pCI-dhfr:** el vector de expresión de mamíferos pCI-neo se obtuvo de Promega (catálogo nº E1841). El vector contiene un potenciador/promotor IE de CMV y gen de neomicina fosfotransferasa. El clon de pSV2-dhfr se obtuvo de ATCC (Catálogo Nº 37146). El plásmido contiene el gen de dhfr murino. La construcción del vector pCI-dhfr se realizó de la siguiente manera:

a. Se digirió el plásmido pSV2-dhfr con la enzima de restricción BglII (extremo 3' del gen dhfr). Se usó ADN polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) para llenar los salientes 5' para formar extremos romos. Después se digirió el ADN con la enzima de restricción AvrII (extremo 5' del gen dhfr). Se aisló el fragmento del gen dhfr (extremo romo de AvrII).

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

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

**Construcción de variantes de hEPO-CTP:** se fusionó un gen de casete que contenía el péptido C terminal (CTP) de la subunidad beta de hCG con la secuencia codificante de EPO humano (NP\_000790.2) en localizaciones diferentes. Se construyeron cuatro variantes de EPO-CTP como se ilustra en las Figuras 1A-D. Se usó el péptido señal proEPO para la construcción de las variantes de EPO-CTP secretadas. Se ligaron fragmentos XbaI - NotI que contenían secuencias de Epo en el vector de expresión pCI-dhfr.

La Tabla 1 a continuación en la presente memoria resume las secuencias de cebadores usadas para construir los polipéptidos que contienen CTP.

**Tabla 1**

Número de cebador	SEC ID Nº	Secuencia	Sitio de restricción (subrayado en secuencia)
1	7	5' <u>ATCTAGAGGTCATCATGGGGTGC</u> 3'	XbaI
2	8	5'ATT <u>GCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG</u> 3'	NotI
17 <sup>R</sup>	9	5' TAAATATTGGGGTGTCCGAGGGCCC 3'	SspI
10	10	5' <u>CCAATATTACCACAAGCCCCACCACGCCTCAT</u> 3'	SspI
11 <sup>R</sup>	11	5' <u>TGCGGCCGCGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC</u> 3'	NotI
15	12	5' GCCCTGCTGTCCGAAGC 3'	
2 <sup>R</sup>	13	5' ATT <u>GCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG</u>	NotI
23 <sup>R</sup>	14	5'CTTTGAGGAAGAGGAGCCCAGGACTGGGAGGC3'	
24	15	5' CCTGGGCTCCTCTTCTCAAAGGC 3'	
38 <sup>R</sup>	48	5' GCTTCCGACAGCAGGGC 3'	

**EPO-1 701-1-p17-6 (Epo-1 - SEC ID Nº: 1):** el fragmento de 702 pb XbaI-NotI se construyó por PCR usando los cebadores anteriores (SEC ID Nº: 7-15, 48). Después se ligó el fragmento de PCR XbaI-NotI que contenía la secuencia Epo-ctp en el vector de expresión pCI-dhfr.

**EPO-2 701-2-p24-2 (Epo-2 - SEC ID Nº: 2):** el fragmento XbaI/ApaI (hGH-ctp) de pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH-ctpx2) se reemplazó por el fragmento XbaI/ApaI (EPO-ctp) de 701-1-p17-6 para crear un Epo-ctpx2.

**EPO-4 701-4-p42-1 (Epo-4 - SEC ID Nº: 4):** en primer lugar, se construyó un fragmento de pCI-dhfr- EPO-ctp (701-1-p17-6) por PCR usando los cebadores 1 y 17 seguido de digestión con XbaI/SspI. Esto dio como resultado un fragmento que contenía EPO y CTP 5' parcial.

En segundo lugar, se construyó un nuevo fragmento por PCR solapante, en pGT123-hEpo como un molde, usando el cebador 10 y el cebador 11. La digestión con SspI/NotI dio como resultado un fragmento que contenía CTP y Epo parcial 3'.

Los dos fragmentos se ligaron en pCI-dhfr para construir el clon p701-4-p42-1.

5 **EPO-3-p56-6 (Epo-3 SEC ID N°: 3):** se obtuvieron cebadores de Sigma-Genosys. Se realizó una reacción de PCR usando el cebador 15 (SEC ID N°: 12) y el cebador 2<sup>R</sup> (SEC ID N°: 13) y ADN plasmídico de pCI-dhfr-EPO-ctp x2 (701-2-p24-2) como un molde. Como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 486 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se aisló un fragmento Stu I-NotI que contenía una secuencia \*Epo-ctp x2 (209 pb).

10 Se realizaron tres reacciones de PCR secuenciales. La primera reacción se realizó con el cebador 1 (SEC ID N°: 7) y el cebador 23<sup>R</sup> (SEC ID N°: 14) y ADN plasmídico de pGT123-epo-ctp como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 80 pb (péptido señal).

15 La segunda reacción se realizó con el cebador 24 (SEC ID N°: 15) y el cebador 11<sup>R</sup> (SEC ID N°: 11) y ADN plasmídico de 701-4-p42-1 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 610 pb.

La última reacción se realizó con los cebadores 1 (SEC ID N°: 7) y 11<sup>R</sup> (SEC ID N°: 11) y una mezcla de los productos de las dos reacciones previas como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 700 pb y se aisló el fragmento XbaI-StuI.

20 Los dos fragmentos (XbaI-StuI y StuI-NotI) se insertaron en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr (ligamiento triple) para producir el clon 701-3-p56-6.

25 **EPO-5-p91-4 (Epo-5 SEC ID N°: 5 - (ctp- Epo):** se pidieron cebadores de Sigma-Genosys. Se realizó una reacción de PCR usando el cebador 1 (SEC ID N°: 7) y cebador 11<sup>R</sup> (SEC ID N°: 11) y ADN plasmídico de pCI-dhfr-ctp-EPO-ctp x2 (701-3-p56-6) como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 670 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó el fragmento XbaI-NotI que contenía la secuencia de ctp-Epo en el vector de expresión eucariota de los inventores pCI-dhfr para producir el clon 701-5-p91-4.

**EPO-6-p90-1 (Epo-6 SEC ID N°: 6 - (ctp- Epo-ctp):** se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 1 (SEC ID N°: 7) y el cebador 38<sup>R</sup> (SEC ID N°: 48) y ADN plasmídico de 701-3-p56-6 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 400 pb.

30 La segunda reacción se realizó con el cebador 15 (SEC ID N°: 12) y el cebador 2<sup>R</sup> (SEC ID N°: 13) y ADN plasmídico de 701-1-p17-6 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 390 pb.

35 La última reacción se realizó con los cebadores 1 (SEC ID N°: 7) y 2<sup>R</sup> (SEC ID N°: 13) y una mezcla de los productos de las dos reacciones previas como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 787 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI-NotI que contenía la secuencia ctp-Epo-ctp se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 701-6-p90-1.

## EJEMPLO 2

### Expresión y aislamiento de polipéptidos EPO-CTP

#### MATERIALES Y MÉTODOS

40 **Transfección de ADN y selección de clones:** se transfectaron células DG44 con vectores de expresión pCI-DHFR que contenían variantes de EPO-CTP usando el Reactivo FuGENE6 (Reactivo de Transfección de FuGENE - Roche Cat. 11 815 091 001). 48 horas después de la transfección, las células se diluyeron y se sembraron a 50-200 células por pocillo en un medio selectivo (Medio CD DG44 sin HT (Gibco: Scotland parte: N° 07990111A) Sku num.:ME060027 complementado con L-Glutamina 8 mM Biological Industries: Cat: 03-020-1A) y 18 ml/l de solución de Pluronic F-68 10 % (Gibco: Cat: 240040-032). Se exploraron clones seleccionados con respecto a la mayor producción de proteínas usando ELISA comercial. Se congelaron 3-5 clones productores por cada variante para un banco de células de reserva. Se adaptó para cultivo un clon seleccionado para cada variante en cultivos a mayor escala hasta matraces de 1 l en una plataforma de agitación orbital. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron por ELISA, SDS-PAGE y transferencia de western. Después de la retirada de alícuotas, los sobrenadantes que contenían proteínas se mantuvieron congelados hasta su uso posterior.

50 **Cultivo celular:** se mantuvieron células DG44 en medio DG44 con HT (cat N° 12610-010, Gibco) complementado con L-Glutamina 8 mM (Biological Industries: Cat: 03-020-1A) y 18 ml/l de solución de Pluronic F-68 10 % (Gibco: Cat: 240040-032), a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> 8 % humidificado. Los clones transfectados se mantuvieron en medio basal DG44 sin complemento de HT, hipoxantina y timidina, con ácido plurónico y L-glutamina.

**Preparación de muestras:** los sobrenadantes se recogieron, se filtraron y se analizaron por ELISA para determinar la concentración de proteínas. Se usaron SDS-PAGE y transferencia de western para determinar la pureza e identidad. Después de ELISA, se definieron las concentraciones de muestras y la solución se dializó frente a PBS. Después de la retirada de alícuotas, los sobrenadantes contenidos en proteínas se mantuvieron congelados a -20 °C hasta su uso posterior.

**Transferencia de western:** se sometieron muestras a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida 15 % no desnaturizantes. Se permitió que los geles se equilibraran durante 10 minutos en Tris 25 mM y glicina 192 mM en metanol al 20 % (vol/vol). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0,2 µm (Sigma, Saint Louis, MO) a 250 mA durante 3 horas, usando una celda de electroforesis Mini Trans-Blot (Biorad Laboratories, Richmond, CA). La membrana de nitrocelulosa se incubó en leche en polvo desgrasada al 5 % durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana se incubó con antisuero de EPO (título 1:1000) durante una noche a 4 °C seguido de tres lavados consecutivos en PBS que contenía Tween 0,1 % (10 minutos/lavado). La membrana se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Zymed, San Francisco, CA) durante 2 h a temperatura ambiente, seguido de tres lavados. Finalmente, se hizo reaccionar el papel de nitrocelulosa con un sustrato quimioluminiscente potenciado (ECL) (Pierce, Rockford, IL) durante 5 minutos, se secó con una lámina de Whatman, y se expuso a una película de rayos X.

## Resultados

La Tabla 2 a continuación en la presente memoria muestra las concentraciones de las diversas formas de EPO modificada por CTP obtenidas de 5 clones seleccionados y su preparación para ensayos adicionales.

**Tabla 2**

Nº de Versión	Nº del Clon	Título de Reserva UI/ml <sup>1</sup>	Después de la dilución en simulación prop. de acuerdo con el título de Epo3 UI/ml <sup>2</sup>	Después de la ultrafiltración UI/ml <sup>3</sup>
Epo0 SEC ID Nº: 16	17	3093	102	335
Epo1 SEC ID Nº: 1	47	1049	104	291
Epo2 SEC ID Nº: 2	67	2160	110	303
Epo3 SEC ID Nº: 3	85	105	119	392
Epo4 SEC ID Nº: 4	112	6100	ND	342

1. La concentración de la reserva de variantes de EPO se determinó por ELISA (ELISA Quantikine IVD Epo, DEP00, R&D Systems)  
 2. Las muestras EPO-0, 1, 2 y 4 se diluyeron a 105 UI/ml en simulación prop (Ajustada a título de Epo3). Epo0 = EPO de tipo silvestre expresada en el mismo sistema que las EPO modificadas por CTP  
 3. Todas las muestras se concentraron y dializaron por ultrafiltración frente a PBS hasta una concentración final de 180 UI/ml.

Todas las proteínas se detectaron por transferencia de Western como se ilustra en la Figura 2.

## EJEMPLO 3

### Actividad biológica de los polipéptidos EPO-CTP

El ensayo de bioactividad de TF-1 presenta la capacidad de las variantes de EPO-CTP para unirse con su receptor y después estimular la actividad que da como resultado la proliferación celular. Por lo tanto, este ensayo se usó como una primera etapa para evaluar la potencia biológica de los polipéptidos EPO-CTP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Análisis de proliferación celular:** se realizó un ensayo de proliferación con la línea celular TF-1, midiendo los niveles de la tinción celular de MTT en función de la actividad de EPO (Kitamura *et al.*, Kitamura, T. *et al.* (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates; Hammerling U. *et al.* In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11): 1455-1469 (1996)). Las células TF-1 que crecían exponencialmente se lavaron dos veces, se sembraron a aproximadamente  $10^4$  células/pocillo en placas de microtitulación, y se incubaron en medio basal con una serie de diluciones valoradas de EPO (Recormon), patrón de EPO (patrón NIBSC), rhEPO (MOD-7010), variantes de MOD-701 (EPO-1, EPO-2, EPO-3 y EPO-4) durante 48 horas. 4 horas antes de ensayar con respecto a proliferación celular, se añadió reactivo MTT a los pocillos, y se midió la absorbancia por un lector de ELISA. Se obtuvo un valor de concentración de proteínas calculado para cada proteína variante de la curva patrón de respuesta a dosis de Eprex (forma artificial de Epoetina (EPO) de la hormona humana).

## RESULTADOS

La actividad biológica *in vitro* de polipéptidos de EPO se determinó con una línea celular dependiente de Epo, eritroleucemia humana TF-1 (Banco de Células DSMZ) [Dong *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Volumen 339, Número 1, 6 de enero de 2006, Páginas 380-385]. Se realizó el ensayo de MTT [Hammerling U. *et al.* In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. Journal of Pharm. Biomed. Analysis 14(11): 1455-1469 (1996).], y el patrón de laboratorio de EPO usado para generar la curva patrón se calibró frente al Patrón Internacional (código de ampolla de Epo 87/684 de NIBSC).

Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación en la presente memoria. Los resultados indican que se consiguió la mayor potencia usando EPO 3 y EPO 0 a concentraciones tanto de 2 como de 0,5 UI/ml.

**Tabla 3**

Patrón de Eprex	Bioactividad de TF-1 UI/ml						
	UI/ml	EPO 0 SEC ID N°: 16	EPO 1 SEC ID N°: 1	EPO 2 SEC ID N°: 2	EPO 3 SEC ID N°: 3	EPO 4 SEC ID N°: 4	Recormon
2	4,93	2,32	2,13	6,91	3,55	3,44	7,40
0,5	1,60	0,76	0,53	1,34	0,84	0,87	1,53

## CONCLUSIÓN

Como se ha resumido en la Tabla 3 anterior en la presente memoria, se ejercieron diferentes niveles de potencia por polipéptidos EPO-CTP, lo que indica diferencias en la unión con el receptor. Los polipéptidos EPO-CTP difieren en el número de casetes de CTP y la localización con la que se fusionan. EPO-1 y EPO-2 contienen 1 secuencia de CTP o 2 secuencias de CTP en el extremo C terminal de EPO, mientras que EPO-3 contiene 1 CTP en el extremo N terminal y 2 secuencias de CTP en el extremo C terminal. EPO-4 es un dímero de dos moléculas de EPO ligadas por la secuencia de CTP. EPO-3 demostró un nivel de potencia bastante similar a WT-EPO, mientras que EPO-1 y EPO-4 fueron aproximadamente 50 % menos potentes que WT-EPO y la potencia de EPO-2 fue incluso menor del 50 %.

## EJEMPLO 4

### **Evaluación de los polipéptidos EPO-CTP en un modelo de ratón**

El siguiente experimento se realizó para comparar la bioactividad de los polipéptidos EPO-CTP y EPO comercial

**Materiales y métodos**

**Animales:**

Especie/Cepa: Ratones ICR o CD-1 de cualquier sexo aproximadamente 20-25 g  
 Tamaño del Grupo: n=7  
 N ° de Grupos: 9  
 N° Total de Animales: n=63

5 **Diseño experimental del estudio:** el experimento se preparó como se resume en la Tabla 4 a continuación en la presente memoria.

**Tabla 4**

N° de Grupo	N° de Ratones por Grupo	TRATAMIENTO		Régimen de Dosificación
		Compuesto	Nivel de Dosis	
1	n=7	Vehículo (Control)	0	1 x semanalmente
2		SIMULACIÓN		
3		MOD-7010	15 µg/kg	
4		MOD-7011		
5		MOD-7012		
6		MOD-7013		
7		MOD-7014		
8		rhEPO Comercial	15 µg/kg	
9			5 µg/kg	

10 **Tratamiento animal:** se administró a todos los animales control o los polipéptidos de EPO de ensayo por inyección de embolada. El volumen de inyección no excedió los 10 ml/kg. La duración del experimento fue de 22 días. Se realizó una comprobación de morbilidad y mortalidad diariamente. **Examen de recuento de reticulocitos y hematocrito (hct):** se llevó a cabo un recuento de reticulocitos en todos los animales de ensayo el día 2 y 14 horas después de la primera inyección de vehículo o tratamiento respectiva. Se determinó el HCT en todos los animales una vez antes del tratamiento inicial (control de línea Basal "0") y a las 24 horas después de la primera inyección de vehículo o tratamiento respectiva, y a continuación dos veces por semana hasta el final del estudio (Día 22).

15 **Resultados**

20 Los resultados de hematocrito que se ilustran en las Figuras 3-5 muestran que EPO 3 tiene el porcentaje de cambio de hematocrito mayor desde la línea basal en comparación con EPO 1, EPO 2, Recormon 1, Recormon 3, rhEPO y vehículo. Los resultados que demuestran el porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con los polipéptidos de EPO-CTP se resumen en la Tabla 5 a continuación en la presente memoria. Estos resultados muestran que EPO-3 es el estimulador de eritropoyesis más potente.

**Tabla 5**

<b>Días</b>	<b>% de reticulocitos</b>	
	<b>2</b>	<b>14</b>
Control	3,72	3,46
	1,08	0,8
Simulación	3,5	3,64
	0,6	1,13
7010 SEC ID N°: 16	3,5	3,9
	0,6	1,54
7011 SEC ID N°: 1	3,52	1,94
	1,38	1,08
7012 SEC ID N°: 2	3,82	3,0
	1,02	0,88
7013 SEC ID N°: 3	2,66	5,20
	0,97	2,96
7014 SEC ID N°: 4	3,48	3,82
	0,71	0,90
Recormon 1/sem	3,23	3,27
	0,73	0,59
Recormon 3/sem	4,13	4,24
	1,21	1,14

**CONCLUSIÓN**

5 El experimento *in vivo* se diseñó para medir dos parámetros; el primero era para medir los parámetros de eritropoyesis tales como el porcentaje de reticulocitos y aumento de los niveles de hemoglobina, RBC y hematocrito. El segundo fue para medir la durabilidad de la actividad biológica de cada variante inyectando dosis una vez por semana.

Se observó un rendimiento superior de EPO-3 en su capacidad para estimular la eritropoyesis en ratones normales.

**EJEMPLO 5**

10 **Comparación de los polipéptidos EPO-CTP con Aranesp**

El siguiente experimento se realizó para comparar la actividad biológica de una única dosis de embolada de algunos polipéptidos EPO-CTP, EPO comercial y Aranesp. Aranesp es una eritropoyetina recombinante de acción prolongada comercial en la que se han introducido dos mutaciones de sitios, dando como resultado dos sitios de N-glucosilación adicionales y un aumento en el número de restos de ácido siálico incorporados.

15 **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Animales:**

Especie/Cepa: Ratones CD-1 hembra de cualquier sexo aproximadamente 20-25 g  
 Tamaño del Grupo: n=3

**Diseño experimental del estudio:** el experimento se preparó como se resume en la Tabla 6 a continuación en la presente memoria.

**Tabla 6**

N° de Grupo	Artículo de Ensayo	Animales/ grupo/ punto temporal	Concentración de Dosis de Solución (µg/ml)	Volumen de Dosis (ml/kg)	Puntos Temporales* (horas después de la administración)
1	MOD-7010 SEC ID N°: 11	3	1,5	10	0 (Predosis), 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 horas después de la administración de la dosis
2	MOD-7013 SEC ID N°: 3	3	1,5	10	0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 horas después de la administración de la dosis
3	Aranesp	3	1,5	10	0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 horas después de la administración de la dosis

- 5 **Tratamiento animal:** se administró a todos los animales control o los polipéptidos de EPO de ensayo por inyección de embolada. El volumen de inyección no excedió los 10 ml/kg. La duración del experimento fue de 14 días. Se realizó una comprobación de morbilidad y mortalidad diariamente.

**Recuento de reticulocitos y examen del hematocrito (hct):** se realizaron recuento de reticulocitos y examen del hematocrito como se ha descrito anteriormente.

## 10 RESULTADOS

Los resultados se ilustran en las Figuras 6-9. Después de una única inyección I.V. de 15 µg/kg de EPO 3, los tres parámetros sanguíneos asociados con eritropoyetina es decir el número de reticulocitos, nivel de hemoglobina y hematocrito, se mejoraron en relación con los obtenidos con una dosis inyectada similar de rhEPO o Aranesp.

### EJEMPLO 6

#### 15 **Comparación de la farmacocinética de polipéptidos EPO-CTP con Aranesp**

Se realizó el siguiente experimento para comparar la farmacocinética del polipéptido de EPO-CTP, EPO comercial y Aranesp.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

- 20 Se analizaron muestras de suero para determinar los niveles de concentración específicos para cada muestra. La concentración y los datos de puntos temporales se procesaron usando análisis no compartimentalizado WinNonLin. Los parámetros determinados incluyeron: AUC, CL, Ke, t1/2, Cmáx, Tmáx y Vdz.

Se determinaron las concentraciones en suero usando dos kits de ELISA en paralelo. Se midió la concentración en suero de EPO-3 usando el kit de ELISA StemCell en comparación con la concentración en suero de EPO-0 y Aranesp que se determinaron usando el kit de ELISA de R&D system.

## 25 RESULTADOS

Los resultados del análisis farmacocinético se resumen en la Tabla 7, a continuación en la presente memoria. Estos resultados muestran que EPO 3 mostró medidas farmacocinéticas favorables como se indica por ejemplo en las medidas de AUC, t1/2 y Cmáx. Las medidas de Tmáx fueron iguales a EPO-0, EPO-3 y Aranesp.

**Tabla 7**

Parámetros	Unidades	EPO-0	EPO-3	Aranesp
AUCfinal	h*mUI/ml	31739	306072	178661
CL <sup>^</sup>	ml/h/kg	1,1152	0,2188	0,1207
Ke	1/h	0,157	0,0529	0,0639
t1/2	H	4,4139	13,1141	10,84
Cmáx	mUI/ml	10766	16466	13266
Tmáx	H	0,25	0,25	0,25
Vdz	ml/kg	7,1017	4,1394	1,8877

5 Los resultados del análisis de concentración en suero se ilustran en la Figura 9. Estos resultados muestran que EPO-3 aún era detectable en el suero después de aproximadamente 190 horas. Tanto EPO-0 como Aranesp no eran detectables en el suero después de aproximadamente 140 horas y 50 horas, respectivamente.

### CONCLUSIÓN

La eliminación de EPO-3 (MOD-7013) de la sangre de ratones CD-1 fue significativamente más lenta que la de rhEPO o Aranesp. Los tiempos de semivida calculados correspondientes fueron: rhEPO – 4,41 h; Aranesp – 0,84 h; y MOD-7013 – 13,11 h.

### 10 EJEMPLO 7

#### Generación de construcciones de hGH

#### MATERIALES Y MÉTODOS

15 Se sintetizaron cuatro clones de hGH (variantes de proteína de 20 kD). Se ligaron fragmentos de XbaI-NotI que contenían secuencias de hGH de las cuatro variantes en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr previamente digerido con XbaI -NotI. Se preparó ADN de los 4 clones (401-0, 1, 2, 3 y 4). También se sintetizó otro clon de hGH parcial (1-242 pb) de la proteína de 22 kD (0606114). Se pidieron cebadores de Sigma-Genosys. Las secuencias de cebadores usadas para generar los polipéptidos de hGH-CTP de la presente invención se resumen en la Tabla 8, a continuación en la presente memoria.

**Tabla 8**

Número de cebador	SEC ID N°	Secuencia	Sitio de restricción (subrayado en la secuencia)
25	27	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
32 <sup>R</sup>	28	5' ACAGGGAGGTCTGGGGTTCTGCA 3'	
33	29	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 <sup>R</sup>	30	5' CCAAACATCAATGTATCTTA 3'	
25	31	5' <u>CTCTAGAGGACATGGCCAC</u> 3'	XbaI
35 <sup>R</sup>	32	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	33	5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTCG 3'	
37 <sup>R</sup>	34	5' <u>ACGCGGCCGC</u> ATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'	NotI
39 <sup>R</sup>	35	5' <u>GCGGCCGCG</u> ACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCC 3'	

**Construcción de 402-0-p69-1 (hGH) SEC ID N°: 36:** MOD-4020 es la hormona del crecimiento humana recombinante de tipo silvestre (sin CTP) que se preparó para su uso como control en los experimentos descritos posteriormente.

5 Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 25 y el cebador 32<sup>R</sup> y ADN plasmídico de 0606114 (clon parcial de hGH 1-242 pb) como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 245 pb.

La segunda reacción se realizó con el cebador 33 y el cebador 4<sup>R</sup> y ADN plasmídico de 401-0-p57-2 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 542 pb.

10 La última reacción se realizó con los cebadores 25 y 4<sup>R</sup> y una mezcla de los productos de las dos reacciones previas como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 705 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI -NotI que contenía la secuencia hGH-0 se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr. El vector se transfectó en células CHO DG-44. Las células se cultivaron en medio sin proteínas.

15 **Construcción de 402-1-p83-5 (hGH-CTP) - SEC ID N°: 37 y 402-2-p72-3(hGH-CTP<sub>x2</sub>) - SEC ID N°: 38:** MOD-4021 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 1 copia del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP de MOD-4021 se unió con el extremo C terminal (un casete). MOD-4022 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 2 copias del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los dos casetes de CTP de MOD-4022 se unieron con el extremo C terminal (dos casetes).

20 Se realizó construcción de hGH-CTP y hGH-CTP-CTP de la misma manera que la construcción de hGH-0. pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH\*-ctp) y pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH\*-ctp x2) se usaron como moldes en la segunda reacción de PCR.

25 Se expresaron MOD-4021 y MOD-4022 en células CHO DG-44. Se cultivaron células en medio sin proteínas. El peso molecular de MOD-4021 es ~30,5 Kd ya que hGH tiene un PM de 22 Kd mientras que cada "casete de CPT" contribuye con 8,5 Kd al peso molecular general (véase Figura 10). El peso molecular de MOD-4022 es de ~39 Kd (véase Figura 10).

30 **Construcción de 402-3-p89-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - SEC ID N°: 39 y 402-4-p82-9(CTP\*hGH-CTP-CTP) - SEC ID N°: 40:** MOD-4023 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 3 copias del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los tres casetes de CTP de MOD-4023 se unieron tanto con el extremo N terminal (un casete) como con el C terminal (dos casetes). MOD-4024 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusiona con 1 copia truncada y 2 completas del péptido C terminal de la cadena beta de la Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP truncado de MOD-4024 se unió con el extremo N terminal y dos casetes de CTP se unieron con el extremo C (dos casetes).

35 Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 25 y el cebador 35<sup>R</sup> y ADN plasmídico de p401-3-p12-5 o 401-4-p22-1 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 265 o 220 pb. La segunda reacción se realizó con el cebador 34 y el cebador 37<sup>R</sup> y ADN plasmídico de TA-hGH-2-q65-1 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 695 pb. La última reacción se realizó con los cebadores 25 y 37<sup>R</sup> y una mezcla de los productos de las dos reacciones previas como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 938 u 891 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento XbaI - NotI que contenía secuencia hGH en el vector de expresión eucariota de los inventores pCI-dhfr.

40 Se expresaron MOD-4023 y MOD-4024 en células CHO DG-44. Las células se cultivaron en medio sin proteínas. El peso molecular de MOD-4023 es de ~47,5 Kd (véase Figura 10) y el peso molecular de MOD-4024 es de ~43,25 Kd (véase Figura 10).

45 **Construcción de 402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP) - SEC ID N°: 41:** se realizó construcción de hGH-6 de la misma manera que la construcción de hGH-3. Se usó pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp) como un molde en la segunda reacción de PCR.

50 **Construcción de 402-5-p96-4 (CTP-hGH) - SEC ID N°: 42:** se realizó reacción de PCR usando el cebador 25 y cebador 39<sup>R</sup> y el ADN plasmídico de pCI-dhfr- ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8) como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 763 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento XbaI -NotI que contenía una secuencia ctp-hGH en el vector de expresión eucariota de los inventores pCI-dhfr para producir el clon 402-5-p96-4.

**EJEMPLO 8****Ensayos de bioactividad in vivo de polipéptidos hGH-CTP de la presente invención**

El siguiente experimento se realizó para ensayar la actividad biológica de acción prolongada potencial de polipéptidos hGH-CTP en comparación con GH humana recombinante comercial y MOD-4020.

**5 MATERIALES Y MÉTODOS**

10 Ratas hipofisectomizadas hembras (60 -100 g) recibieron una inyección S.C. semanal de 21,7 µg de polipéptidos de hGH-CTP o una inyección S.C. de 5 µg al día una vez de rhGH comercial de control. Se midió el peso en todos los animales antes del tratamiento, 24 horas después de la primera inyección y después cada dos días hasta el final del estudio el día 21. Cada punto representa el porcentaje de aumento de peso medio del grupo ((Peso el día 0-peso el último día)/Peso el día 0). El aumento de peso medio se normalizó frente a inyección una vez al día de hGH comercial. El programa de tratamiento se resume en la Tabla 9.

**Tabla 9**

Nº	Fármaco	N	Vía	Programa de Tratamiento	Dosis Equimolar (µg/rata)	Dosificación Acumulada (µg/rata)	Volumen de Dosis (ml)
1	Vehículo	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/Semana	ND	ND	0,25
2	Simulación	7	s.c.	días 1, 7 y 13;1/ Semana	ND	ND	0,25
3	MOD-4020 SEC ID N°: 36	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/ Semana	21,7	65	0,25
4	MOD-4021 SEC ID N°: 37	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/ Semana	21,7	65	0,25
5	MOD-4022 SEC ID N°: 38	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/ Semana	21,7	65	0,25
6	MOD-4023 SEC ID N°: 39	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/ Semana	21,7	65	0,25
7	MOD-4024 SEC ID N°: 40	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/ Semana	21,7	65	0,25
8	hGH Comercial v.1	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/Semana	21,7	65	0,25
9	hGH Comercial v.1	7	s.c.	días 1-13; d/ Semana	5	65	0,25

**RESULTADOS**

15 Los resultados se resumen en la Figura 11. Estos resultados muestran que MOD-4023 (SEC ID N°: 39) y MOD-4024 (SEC ID N°: 40) indujeron más del 120 % de aumento de peso en comparación con rhGH comercial que indujo el 100 % de aumento de peso.

**CONCLUSIÓN**

20 3 dosis semanales (Días de inyecciones; 1, 7 y 13) de 21,7 µg de MOD-4023 (SEC ID N°: 39) y MOD-4024 (SEC ID N°: 40) indujeron un aumento de peso 30 % mayor en ratas hipofisectomizadas en comparación con en las que se inyectó rhGH comercial a la misma dosis acumulada que se administró una vez al día a una dosis de 5 µg durante 13 días.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Modigene Inc FARES, Fuad FIMA, Udi Eyal

5 <120> POLIPÉPTIDOS DE ACCIÓN PROLONGADA Y MÉTODOS PARA PRODUCIRLOS Y ADMINISTRARLOS

<130> P-9520-EP3

10 <140> 12150722.2  
<141> 05-02-2007

<150> 60/764.761  
<151> 03-02-2006

15 <160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1  
<211> 221  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 1

ES 2 494 792 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2  
<211> 249  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400>2

5

ES 2 494 792 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
245

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

5

<400>3

ES 2 494 792 T3

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

ES 2 494 792 T3

180 185 190  
 Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu  
 195 200 205  
 Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser  
 210 215 220  
 Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
 245 250 255  
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
 260 265 270  
 Pro Ile Leu Pro Gln  
 275

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

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

ES 2 494 792 T3

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

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

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

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

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

Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala  
 225 230 235 240

Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu  
 245 250 255

Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp  
 260 265 270

Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu  
 275 280 285

Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn  
 290 295 300

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

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

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

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

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

Gly Asp Arg  
 385

- 5 <210> 5  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

ES 2 494 792 T3

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

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys  
 20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser  
 35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser  
 50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile  
 65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val  
 85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly  
 100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala  
 115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu  
 130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu  
 145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro  
 165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr  
 180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu  
 195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
 210 215 220

5 <210> 6  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

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

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

<210> 7  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo para construcciones EPO-CTP

<400> 7  
 aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25

5

10

<210> 8  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador directo para construcciones EPO-CTP  
 <400> 8  
 10     attgcgcccg cggatccaga agaccttat tg           32  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 15     <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para construcciones EPO-CTP  
 20  
 <400> 9  
     taaattgg ggtgtccgag ggccc           25  
 <210> 10  
 <211> 32  
 25     <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para construcciones EPO-CTP  
 30  
 <400> 10  
     ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at           32  
 <210> 11  
 <211> 35  
 35     <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para construcciones EPO-CTP  
 40  
 <400> 11  
     tgcggccgcg gatccttatc tgcacctgt cctgc           35  
 45  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador directo para construcciones EPO-CTP  
 <400> 12  
 55     gccctgctgt cggaagc           17  
 <210> 13  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para construcciones EPO-CTP  
 <400> 13  
 65     attgcgcccg cggatccaga agaccttat tg           32

5  
<210> 14  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador inverso para construcciones EPO-CTP  
  
<400> 14  
10 cttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc 32  
  
<210> 15  
<211> 24  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador directo para construcciones EPO-CTP  
  
<400> 15  
20 cctgggctcc tcttctcaa aggc 24  
  
<210> 16  
<211> 193  
25 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 16

ES 2 494 792 T3

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

Arg

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

5

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de CTP

10

<400> 17

ES 2 494 792 T3

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser  
 1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu  
 20 25 30

Pro Gln

<210> 18

5 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de CTP

<400> 18

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 20 25

15 <210> 19  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly  
 20 25

25 <210> 20  
 <211> 786  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 20

ES 2 494 792 T3

tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct 60  
 tctgtcgctc cctctggggc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctcccc 120  
 gagccttcca agtccatccc gactccccgg gccctcggac accccaatat taccacaagc 180  
 cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240  
 ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300  
 cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360  
 agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420  
 ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480  
 ccttcgcagc ctaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540  
 tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600  
 cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660  
 caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc 720  
 ccgactcccg gggccctcgg acaccccgat cctcccacaa taaaggctct ctggatccgc 780  
 ggccgc 786

<210> 21  
 <211> 873  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 21

tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct 60  
 tctgtcgctc cctctggggc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctcccc 120  
 gagccttcca agtccatccc gactccccgg gccctcggac accccaatat taccacaagc 180  
 cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240  
 ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300  
 cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360  
 agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420  
 ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480  
 ccttcgcagc ctaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540  
 tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600  
 cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660  
 caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc 720  
 ccgactcccg gggccctcgg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc 780  
 tcctccatcc ctgccatccc cctcccggct gcctggcccc tctgacacc ctatctctgccc 840  
 tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc 873

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

10

15

ES 2 494 792 T3

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 23  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 23

ES 2 494 792 T3

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

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu  
20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln  
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys  
50 55 60

Val Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe  
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp  
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val  
115 120 125

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

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

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

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

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

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
210 215

<210> 24  
<211> 166  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 24

5

ES 2 494 792 T3

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

5 <210> 25  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25

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

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

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

ES 2 494 792 T3

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

Thr Thr Ala Leu Ser  
 20

- 5 <210> 27  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 10 <220>  
 <223> Cebador directo Xbal para construcciones HGH-CTPP  
 <400> 27  
 ctctagagga catggccac 19
- 15 <210> 28  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 20 <220>  
 <223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP  
 <400> 28  
 acagggaggt ctgggggttc tgca 24
- 25 <210> 29  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 30 <220>  
 <223> tgcagaacct ccagacctcc ctgtgc  
 <400> 29  
 tgcagaacct ccagacctcc ctgtgc 26
- 35 <210> 30  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 40 <220>  
 <223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP  
 <400> 30  
 ccaaactcat caatgtatct ta 22
- 50 <210> 31  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 55 <220>  
 <223> Cebador directo Xbal para construcciones HGH-CTPP  
 <400> 31  
 ctctagagga catggccac 19  
 <210> 32  
 <211> 25

# ES 2 494 792 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP

<400> 32  
cgaactcctg gtaggtgtca aaggc 25

10 <210> 33  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Cebador directo para construcciones HGH-CTP

<400> 33  
gccttgaca cctaccagga gttcg 25

20 <210> 34  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Cebador inverso NotI para construcciones HGH-CTP

<400> 34  
acggggcgc atccagacct tcatcactga ggc 33

30 <210> 35  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP

40 <400> 35  
gcggccgcgg actcatcaga agccgcagct gcc 34

45 <210> 36  
<211> 217  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36

ES 2 494 792 T3

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

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu  
20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln  
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe  
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp  
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val  
115 120 125

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

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

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

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

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

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
210 215

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

5

<400> 37

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

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu  
20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln  
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys  
50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe  
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp  
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val  
115 120 125

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

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

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

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

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

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
210 215 220

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr  
225 230 235 240

Pro Ile Leu Pro Gln  
245

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

5

<400> 38

ES 2 494 792 T3

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

ES 2 494 792 T3

<210> 39  
<211> 301  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
  
<400> 39

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

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

ES 2 494 792 T3

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

<210> 40  
 <211> 285  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 494 792 T3

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 494 792 T3

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

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

5 <210> 41  
 <211> 273  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 494 792 T3

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

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

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

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

Gln

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

5

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 494 792 T3

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

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

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

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

Gly Ser Cys Gly Phe  
 245

5 <210> 43  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos de CTP  
 <400> 43

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

15 <210> 44  
 <211> 853  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 44

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60  
 cctgccatgg ctgcaggagg gcagcggccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120  
 gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180  
 catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240  
 ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300  
 ctctctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360  
 cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420  
 ccagagctgg ctggagcccg tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta 480  
 cggcggcagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540  
 cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacct 600  
 cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgcctcg ctgaagaact acgggctgct 660  
 gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720  
 aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gccctcccc cgagcctgcc 780  
 ctccccaaagc aggetgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc 840

tggatgcggc cgc

853

5 <210> 45  
 <211> 937  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 45

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

10

<210> 46  
 <211> 889  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 46

ES 2 494 792 T3

tctāgaggāc atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg	60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcggccag ctcttcttct aaggctccac ccccgagcct	120
gcccttcccc accatcccc tgagcaggct gttcgacaac gccatgctga gggctcacag	180
gctgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagtctgag gaagcctaca tccccaggga	240
gcagaagtac agcttctctg agaacccccā gacctccctg tgcttcagcg agagcatccc	300
cacccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc	360
cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgccaa	420
cagcctggtg tacggcgcca gcgacagcaā cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga	480
gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt	540
caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaā cagccacaac gacgacgcc tgctgaagaa	600
ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcctgaggat	660
cgtgcagtgc agaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggccctcc	720
cccgagcctg ccttccccāā gcaggctgcc tgggccctcc gacacaccaā tcctgccaca	780
gagcagctcc tctaaggccc ctctccatc cctgccatcc cctcccggc tgcttgcccc	840
ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgatg aaggctctgga tgcggccgc	889

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

5

ES 2 494 792 T3

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

<210> 48  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

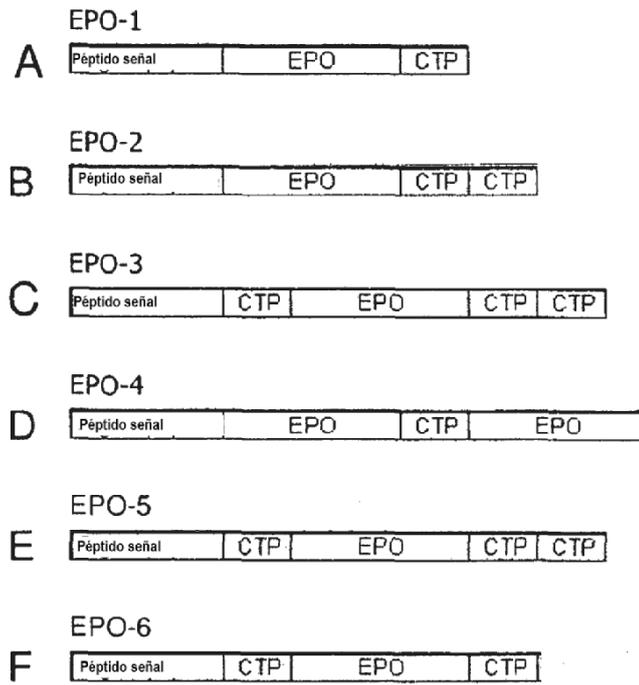
<220>  
 <223> Cebador inverso para construcciones EPO-CTP

<400> 48  
 gcttccgaca gcagggc 17

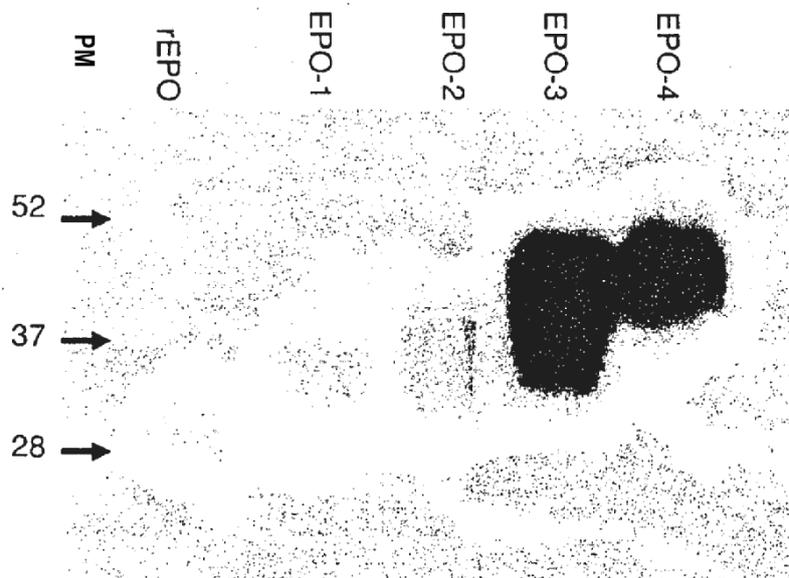
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende un péptido de interés, en el que un primer péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica está unido con el extremo amino terminal de dicho péptido de interés, y un segundo y tercer péptidos carboxilo terminales de gonadotropina coriónica están unidos con el extremo carboxilo terminal de dicho péptido de interés, en el que el péptido carboxilo terminal de gonadotropina es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, en el que dicho péptido de interés es un péptido de la hormona del crecimiento, y en el que dicho péptido de la hormona del crecimiento muestra actividad hGH y es al menos 50 % homólogo de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho péptido de interés está glucosilado.
- 10 3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho péptido de interés no está glucosilado.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica está glucosilado.
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia de dicho péptido de la hormona del crecimiento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 39-41.
- 15 6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la secuencia de al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18.
7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica está truncado, y en el que dicho péptido carboxilo terminal truncado comprende al menos un sitio de glucosilación.
- 20 8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica está glucosilado.
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un péptido señal.
- 25 10. El polipéptido de la reivindicación 9, en el que dicho péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 19.
11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica está unido con dicho polipéptido de hGH mediante un enlazador.
12. El polipéptido de la reivindicación 11, en el que dicho enlazador es un enlace peptídico.
- 30 13. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
14. El polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.
15. El polinucleótido de la reivindicación 14, en el que la secuencia de dicho polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 44-46.
- 35 16. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 14-15, en el que dicho polipéptido comprende además un péptido señal.
17. El polinucleótido de la reivindicación 16, en el que la secuencia de dicho péptido señal es como se expone en SEC ID N°: 19.
18. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17.
19. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 18.
- 40 20. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17, el vector de expresión de la reivindicación 18, la célula de la reivindicación 19, o su combinación.
21. El uso de un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 14-17 para la preparación de un medicamento para tratar una afección del crecimiento, relacionada con el peso o metabólica.
- 45 22. El uso de la reivindicación 21, en el que la secuencia de al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 17-18.

23. Un método para mejorar la semivida biológica y conservar una actividad biológica de un péptido de interés, que comprende la etapa de unir un primer péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica con el extremo amino terminal de dicho péptido de interés y un segundo y tercer péptidos carboxilo terminales de gonadotropina coriónica con el extremo carboxilo terminal de dicho péptido de interés, mejorando de este modo la semivida biológica de dicho péptido de interés, en el que el péptido carboxilo terminal de gonadotropina es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, en el que dicho péptido de interés es un péptido de la hormona del crecimiento, y en el que dicho péptido de la hormona del crecimiento muestra actividad hGH y es al menos 50 % homólogo de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47.
24. El método de la reivindicación 23, en el que la secuencia de al menos un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en SEC ID N°: 17-18.
25. Un método para producir un polipéptido de la hormona del crecimiento en una célula aislada, que comprende la etapa de transfectar dicha célula con un vector de expresión que comprende una parte codificante que codifica un polipéptido, consistiendo dicho polipéptido en un polipéptido de hGH, dos péptidos carboxilo terminales de gonadotropina coriónica unidos con el extremo carboxilo terminal de dicho polipéptido de hGH, y un péptido carboxilo terminal de gonadotropina coriónica unido con el extremo amino terminal de dicho polipéptido de hGH, en el que el péptido carboxilo terminal de gonadotropina es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, y en el que dicho péptido de la hormona del crecimiento muestra actividad hGH y es al menos 50 % homólogo de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 47, produciendo de este modo un polipéptido de hGH en una célula aislada.
26. El método de la reivindicación 25, en el que dicho polipéptido comprende además un péptido señal.
27. El método de la reivindicación 26, en el que la secuencia de dicho péptido señal es como se expone en SEC ID N°: 19.
28. El método de la reivindicación 25, en el que dicha parte codificante se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 44, SEC ID N°: 45 y SEC ID N°: 46.
29. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-17 para uso en el tratamiento de una afección del crecimiento, relacionada con el peso o metabólica.



**FIGURAS 1 A-F**



**FIGURA 2**

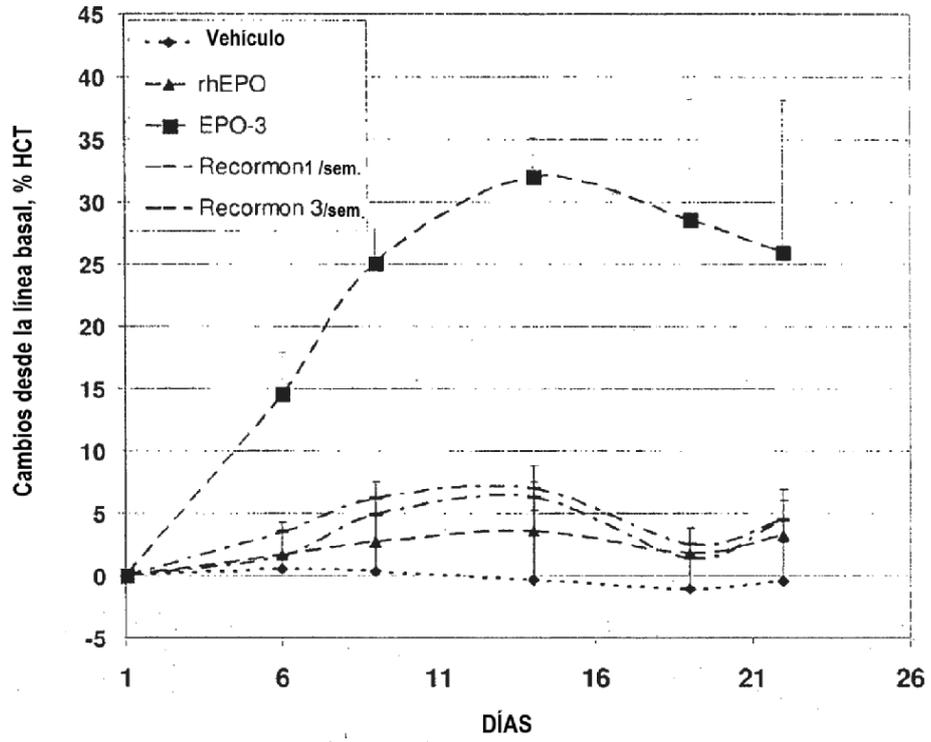


FIGURA 3

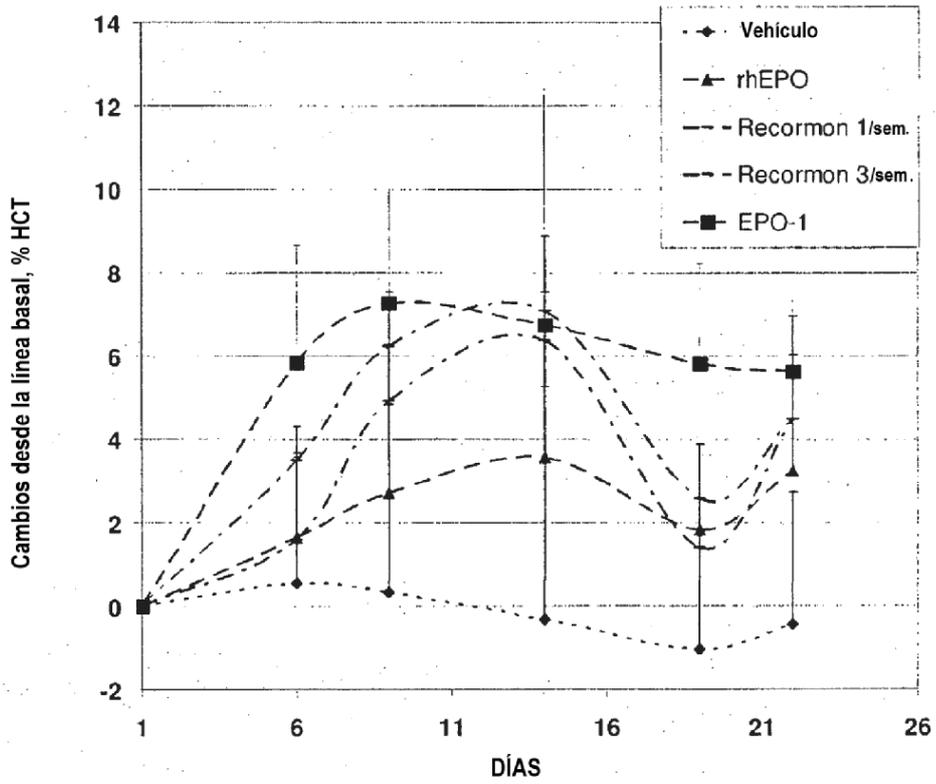


FIGURA 4

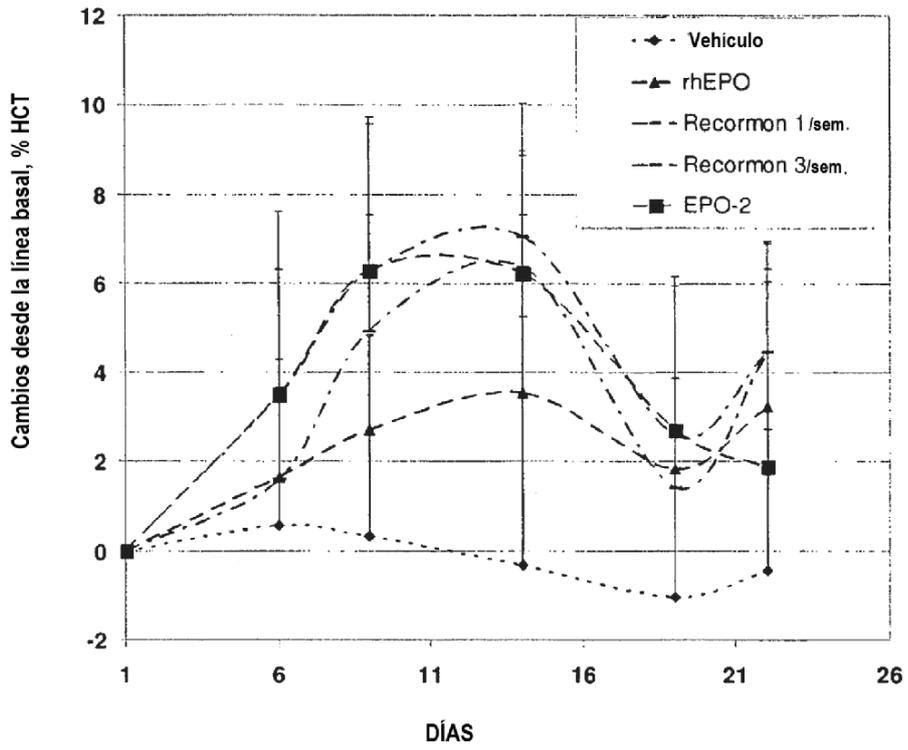


FIGURA 5

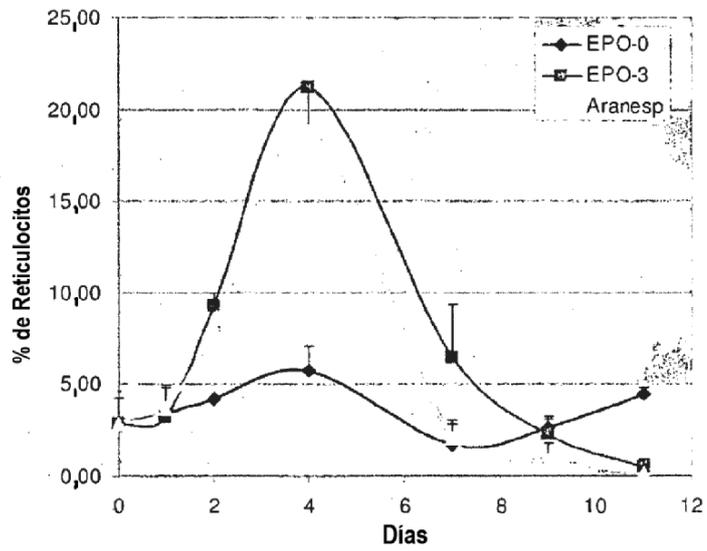


FIGURA 6

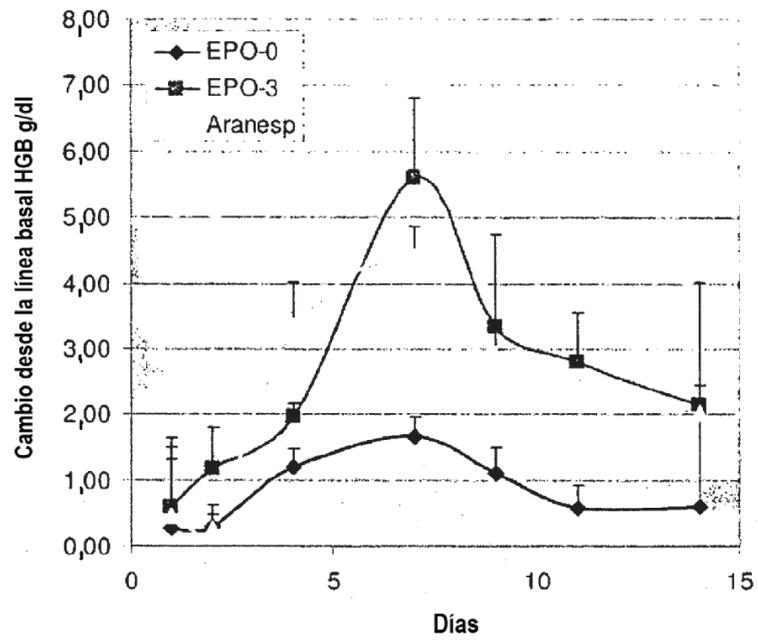


FIGURA 7

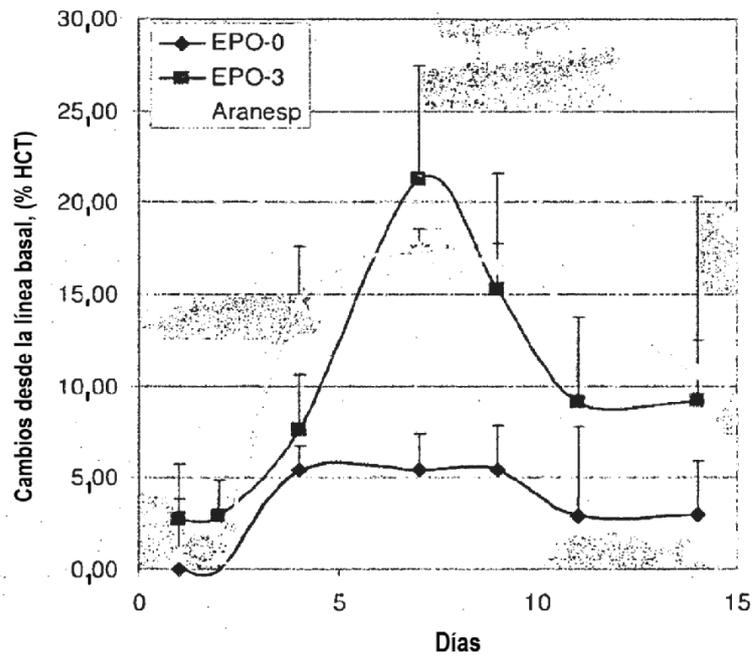


FIGURA 8

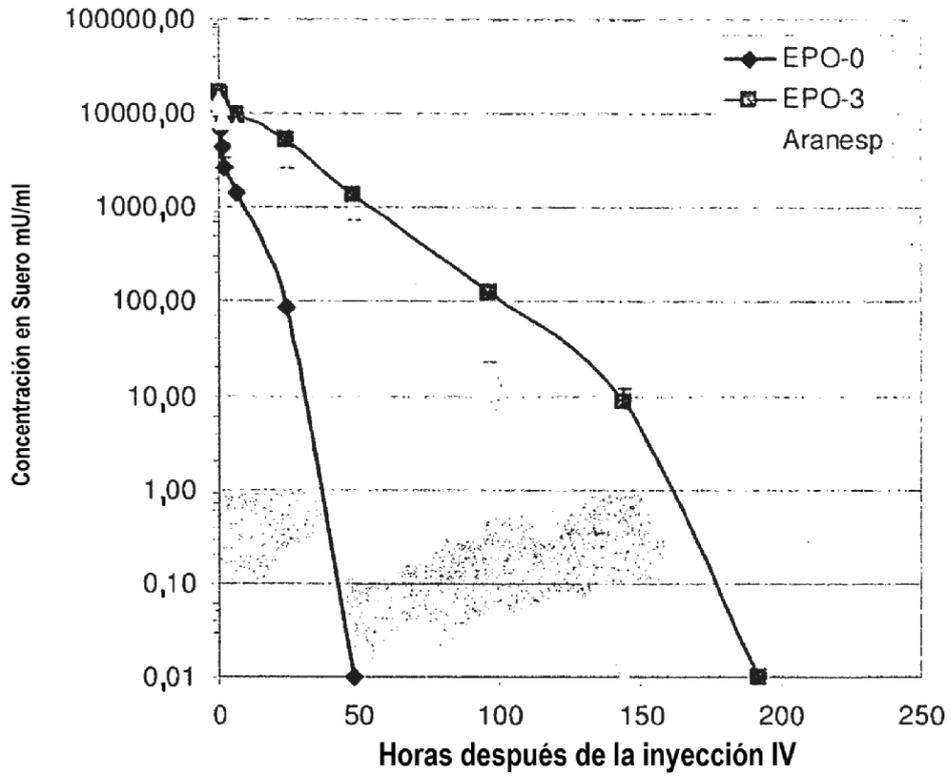


FIGURA 9

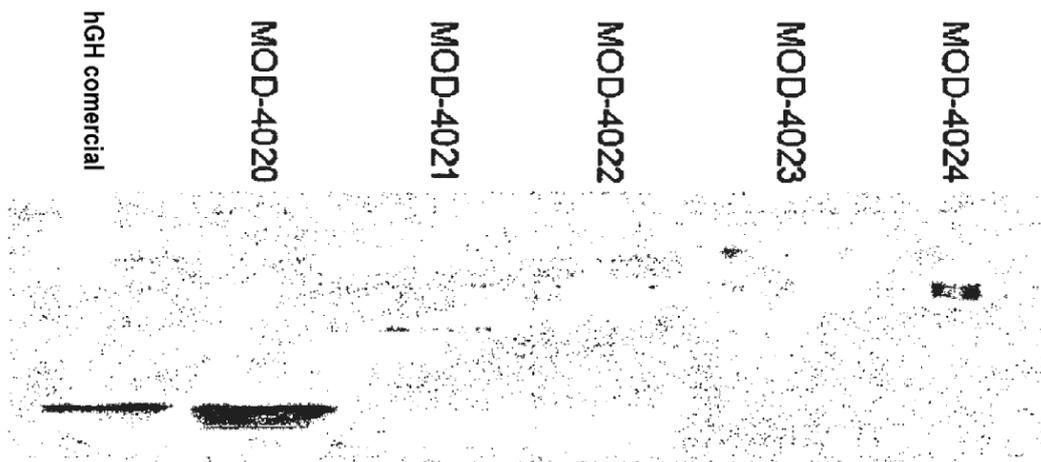


FIGURA 10

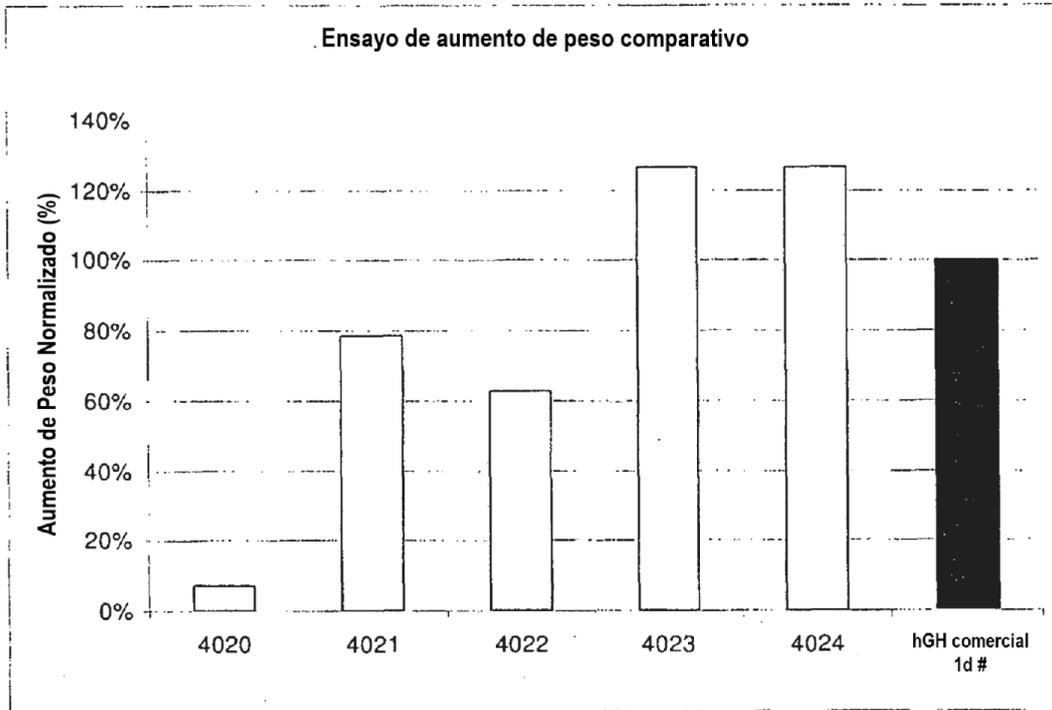


FIGURA 11