

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 925**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/40** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/41** (2006.01)

**C07K 14/79** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2003 E 03749159 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1611093**

54 Título: **Proteínas de fusión de transferrina modificadas**

30 Prioridad:

**30.08.2002 US 406977 P**  
**04.03.2003 US 378094**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.10.2015**

73 Titular/es:

**BIOREXIS PHARMACEUTICAL CORPORATION**  
**(100.0%)**  
**235 EAST 42ND STREET**  
**NEW YORK, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**PRIOR, CHRISTOPHER P.;**  
**LAI, CHAR-HUEI;**  
**SADEGHI, HOMAYOUN y**  
**TURNER, ANDREW J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 547 925 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de transferrina modificadas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas o péptidos terapéuticos con estabilidad en suero extendida o semivida circulatoria *in vivo* fusionada con o insertada en una molécula transferrina modificada para reducir o inhibir la glucosilación, unión a hierro y/o unión al receptor de transferrina. Específicamente, la presente invención incluye  
10 GLP-1 fusionada con o insertada en una molécula de transferrina modificada.

**Antecedentes de la invención**

15 Las proteínas o los péptidos terapéuticos en su estado nativo o cuando se producen de forma recombinante son normalmente moléculas lábiles que muestran periodos cortos de estabilidad en suero o semividas circulatorias *in vivo* cortas. Además, estas moléculas son con frecuencia extremadamente lábiles cuando se formulan, particularmente cuando se formulan en soluciones acuosas para fines de diagnóstico y terapéuticos.

20 Existen pocas soluciones prácticas para extender o promover la estabilidad *in vivo* o *in vitro* de moléculas terapéuticas proteicas. El polietilenglicol (PEG) es una sustancia que puede unirse a una proteína, dando como resultado actividad sostenida, de acción más larga, de la proteína. Si la actividad de una proteína se prolonga por la unión con PEG, la frecuencia con la que es necesario administrar la proteína puede reducirse. La unión a PEG, sin embargo, con frecuencia reduce o destruye la actividad terapéutica de la proteína. Aunque en algunos casos la unión con PEG puede reducir la inmunogenicidad de la proteína, en otros casos puede aumentar la  
25 inmunogenicidad.

Las proteínas o los péptidos terapéuticos también se han estabilizado mediante fusión con una proteína capaz de extender la semivida circulatoria *in vivo* de la proteína terapéutica. Por ejemplo, las proteínas terapéuticas fusionadas con albúmina o con fragmentos de anticuerpos pueden mostrar semivida circulatoria *in vivo* extendida en  
30 comparación con la proteína terapéutica en el estado no fusionado. Véase Patentes de Estados Unidos 5.876.969 y 5.766.883.

Otra proteína del suero, transferrina humana glucosilada (Tf) también se ha usado para realizar fusiones con proteínas terapéuticas para dirigir el suministro al interior de células o para transportar agentes a través de la barrera hematoencefálica. Estas proteínas de fusión que comprenden Tf humana glucosilada se han usado para dirigirse al factor de crecimiento nervioso (NGF) o factor neurotrófico ciliar (CNTF) a través de la barrera hematoencefálica fusionando Tf de longitud completa con el agente. Véase Patentes de Estados Unidos 5.672.683 y 5.977.307. En estas proteínas de fusión, la parte Tf de la molécula está glucosilada y se une a dos átomos de hierro, lo que es necesario para la unión de Tf con su receptor en una célula y, de acuerdo con los inventores de estas patentes, para  
40 dirigir el suministro del resto de NGF o CNTF a través de la barrera hematoencefálica. También se han producido proteínas de fusión de transferrina insertando una secuencia diana de proteasa del VIH-1 en bucles expuestos en superficie de transferrina glucosilada para investigar la capacidad para producir otra forma de fusión de Tf para suministro dirigido al interior de una célula mediante el receptor de Tf (Ali *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274(34): 24066-24073).  
45

La transferrina del suero (Tf) es una glucoproteína monomérica con un peso molecular de 80.000 Dalton que se une al hierro en la circulación y lo transporta a diversos tejidos mediante el receptor de transferrina (TfR) (Aisen *et al.* (1980) Ann. Rev. Biochem. 49: 357-393; MacGillivray *et al.* (1981) J. Biol. Chem. 258: 3543-3553, Patente de Estados Unidos 5.026.651). Tf es una de las moléculas del suero más habituales, que comprende hasta  
50 aproximadamente el 5-10 % de las proteínas de suero totales. Se produce transferrina deficiente en carbohidratos en niveles elevados en la sangre de individuos alcohólicos y muestra una semivida mayor (aproximadamente 14-17 días) que la de la transferrina glucosilada (aproximadamente 7-10 días). Véase van Eijk *et al.* (1983) Clin. Chim. Acta 132: 167-171, Stibler (1991) Clin. Chem. 37: 2029-2037 (1991), Arndt (2001) Clin. Chem. 47(1): 13-27 y Stibler *et al.* en "Carbohydrate-deficient consumption", Advances in the Biosciences, (Ed Nordmann *et al.*), Pergamon, 1988, Vol. 71, páginas 353-357).  
55

La estructura de Tf se ha caracterizado bien y se ha dilucidado el mecanismo de la unión al receptor, unión a hierro y liberación y unión a ión carbonato (Patentes de Estados Unidos 5.026.651, 5.986.067 y MacGillivray *et al.* (1983) J. Biol. Chem. 258(6): 3543-3546).  
60

La transferrina y anticuerpos que se unen con el receptor de transferrina también se han usado para suministrar o transportar agentes tóxicos a células tumorales como terapia de cáncer (Baselga y Mendelsohn, 1994), y la transferrina se ha usado como un vector de terapia génica no viral para suministrar ADN a células (Frank *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1992). La capacidad para suministrar proteínas al sistema nervioso central (SNC) usando el receptor de transferrina como el punto de entrada se ha demostrado con varias proteínas y péptidos incluyendo CD4 (Walus *et al.*, 1996), factor neurotrófico derivado de cerebro (Pardridge *et al.*, 1994), factor neurotrófico derivado de  
65

células gliales (Albeck *et al.*), un análogo peptídico vasointestinal (Bickel *et al.*, 1993), un péptido beta amiloide (Saito *et al.*, 1995) y un oligonucleótido antisentido (Pardridge *et al.*, 1995).

5 Las proteínas de fusión de transferrina, sin embargo, no se han modificado o desarrollado técnicamente para extender la semivida circulatoria *in vivo* de una proteína o péptido terapéutico o para aumentar la biodisponibilidad reduciendo o inhibiendo la glucosilación del resto de Tf ni para reducir o prevenir la unión al receptor de Tf y/o hierro.

### Sumario de la invención

10 Como se describe en más detalle posteriormente, la presente invención incluye proteínas de fusión Tf modificadas que comprenden péptido de tipo glucagón (GLP-1), en las que la parte de Tf se modifica técnicamente para extender la semivida circulatoria *in vivo* o la biodisponibilidad de la molécula. La invención también incluye formulaciones farmacéuticas y composiciones que comprenden las proteínas de fusión y moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de Tf modificadas. La solicitud describe además métodos para extender la estabilidad en suero, semivida en circulación *in vivo* y biodisponibilidad de GLP-1 mediante fusión con una transferrina modificada. También se describen en el presente documento métodos para tratar a un paciente con una proteína de fusión de Tf modificada.

20 Preferentemente, las proteínas de fusión de Tf modificadas comprenden un resto de Tf de transferrina humana que se ha modificado para reducir o prevenir la glucosilación y/o unión a hierro y receptor.

25 La presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden GLP-1 fusionadas con o insertadas en moléculas de transferrina modificadas. Otras proteínas terapéuticas descritas en el presente documento incluyen interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), péptido mimético de EPO (eritropoyetina) (EMP1), y T-20.

30 También se describen en el presente documento proteínas de fusión que comprenden un fragmento de receptor de toxina soluble que se une a una toxina fusionada con o insertada en la transferrina o moléculas de transferrina modificadas. El receptor de toxina soluble puede ser sinaptotagmina 1 y el fragmento soluble es los aminoácidos 1-53 (SEC ID N<sup>o</sup>: 4).

### Breve descripción de los dibujos

35 **La Figura 1** muestra un alineamiento de los Dominios N y C de transferrina (Tf) Humana (Hu) (SEC ID N<sup>o</sup>: 3) con similitudes e identidades destacadas.

**Las Figuras 2A-2B** muestran un alineamiento de secuencias de transferrina de diferentes especies. Sombreado Claro: Similitud; Sombreado Oscuro: Identidad (SEC ID N<sup>o</sup>: 84-90).

40 **La Figura 3** muestra la localización de varios sitios de inserción expuestos en superficie de Tf para proteínas, polipéptidos o péptidos terapéuticos.

**La Figura 4** muestra la farmacocinética de mTf-T20 en dos conejos.

### Descripción detallada

#### Descripción general

45 La presente invención se basa en parte en el hallazgo por los inventores de que pueden estabilizarse proteínas terapéuticas para extender su semivida en suero y/o actividad *in vivo* fusionando genéticamente las proteínas terapéuticas a transferrina, transferrina modificada, o una parte de transferrina o transferrina modificada suficiente para extender la semivida de la proteína terapéutica en suero. Las proteínas de fusión de transferrina modificadas incluyen una proteína o dominio de transferrina unido covalentemente con una proteína o un péptido terapéutico, en el que la parte de transferrina se modifica para contener una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de transferrina de tipo silvestre. En una realización, las proteínas de fusión de Tf se modifican técnicamente para reducir o prevenir la glucosilación dentro de la Tf o un dominio de Tf. En otras realizaciones, la proteína Tf o el dominio o los dominios Tf se modifica para mostrar unión reducida o no mostrar unión con hierro o para tener una afinidad reducida o no unirse con un receptor de Tf (TfR).

60 Las proteínas terapéuticas descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, polipéptidos, anticuerpos, péptidos o fragmentos o variantes de los mismos. Las proteínas terapéuticas descritas en el presente documento incluyen interferón- $\beta$ , péptido mimético de EPO (EMP1), y T-20. Se usan moléculas de GLP-1 en la presente invención.

65 También se describen en el presente documento proteínas de fusión antitoxina que comprenden un fragmento de receptor de toxina soluble fusionado o insertado en transferrina o transferrina modificada. Preferentemente, el

fragmento de receptor de toxina soluble se une a una toxina específica. En un ejemplo, el fragmento de receptor de toxina soluble es los aminoácidos 1-53 (SEC ID N°: 4) de sinaptotagmina 1.

5 La presente invención incluye proteínas de fusión de transferrina modificadas de acuerdo con las reivindicaciones y composiciones terapéuticas que comprenden las proteínas de fusión, y dichas proteínas y composiciones para uso en métodos de tratamiento, prevención o alivio de enfermedades o trastornos administrando las proteínas de fusión. Una proteína de fusión de transferrina de la invención incluye una molécula de GLP-1 y una proteína de transferrina modificada, que se asocian entre sí, preferentemente por fusión genética (es decir, la proteína de fusión de transferrina se genera por traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica toda o una parte de GLP-1 se une en fase a un polinucleótido que codifica toda o una parte de transferrina modificada) o conjugación química entre sí. La proteína GLP-1 y proteína transferrina, una vez que son parte de la proteína de fusión de transferrina, pueden denominarse “parte”, “región” o “resto” de la proteína de fusión de transferrina (por ejemplo, una “parte proteica terapéutica” o una “parte proteica de transferrina”).

15 En una realización, la invención proporciona una proteína de fusión de transferrina que comprende, o como alternativa que consiste en, una molécula de GLP-1 y una proteína de transferrina en suero modificada.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

### Definiciones

25 Como se usa en el presente documento, un “aminoácido correspondiente a” o un “aminoácido equivalente” en una secuencia de transferrina se identifica por alineamiento para maximizar la identidad o similitud entre una primera secuencia de transferrina y al menos una segunda secuencia de transferrina. El número usado para identificar un aminoácido equivalente en una segunda secuencia de transferrina se basa en el número usado para identificar el aminoácido correspondiente en la primera secuencia de transferrina. En ciertos casos, estas expresiones pueden usarse para describir los restos de aminoácidos en transferrina humana en comparación con ciertos restos en transferrina de suero de conejo.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “actividad biológica” se refiere a una función o un conjunto de actividad realizadas por una molécula, proteína o péptido terapéutico en un contexto biológico (es decir, en un organismo o en un modelo *in vitro* del mismo). Las actividades biológicas pueden incluir pero sin limitación las funciones de la parte de molécula terapéutica de las proteínas de fusión reivindicadas, tal como, pero sin limitación, la inducción de secreción de matriz extracelular de líneas celulares sensibles, la inducción de secreción de hormonas, la inducción de quimiotaxis, la inducción de mitogénesis, la inducción de diferenciación, o la inhibición de la división celular de células sensibles. Se considera que un péptido o una proteína de fusión de la invención son biológicamente activos si muestran una o más actividades biológicas de su homólogo nativo de proteína terapéutica.

45 Como se usa en el presente documento, los “aglutinantes” son agentes usados para transmitir cualidades cohesivas al material en polvo. Los aglutinantes, o “granuladores” como se conocen en ocasiones, transmiten una cohesión a la formulación de comprimidos, que asegura que el comprimido permanece intacto después de la compresión, así como mejora las cualidades de flotación por la formulación de gránulos del tamaño y la dureza deseados. Los materiales habitualmente usados como agentes de unión incluyen almidón; gelatina; azúcares, tales como sacarosa, glucosa, dextrosa, melaza y lactosa; gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, alginato sódico, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, Veegum, celulosa microcristalina, dextrosa microcristalina, amilosa y arabogalactano de alerce, y similares.

55 Como se usa en el presente documento, el término “transportador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra una composición. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

60 Como se usa en el presente documento, los “agentes colorantes” son agentes que proporcionan a los comprimidos una apariencia más agradable, y además ayudan al fabricante a controlar el producto durante su preparación y ayudan al usuario a identificar el producto. Cualquiera de los colorantes FD y C solubles en agua certificados aprobados, mezclas de los mismos, o sus lacas correspondientes pueden usarse para colorear los comprimidos. Una laca de color que es la combinación por absorción de un colorante soluble en agua con un óxido hidroso de un metal pesado, dando como resultado una forma insoluble del colorante.

65 Como se usa en el presente documento, los “diluyentes” son sustancias inertes añadidas para aumentar el volumen de la formulación para hacerle al comprimido de un tamaño práctico para compresión. Los diluyentes usados

habitualmente incluyen fosfato cálcico, sulfato cálcico, lactosa, caolín, manitol, cloruro sódico, almidón seco, azúcar en polvo, sílice y similares.

5 Como se usa en el presente documento, los “disgregadores” o “disgregantes” son sustancias que facilitan la rotura o disgregación de comprimidos después de su administración. Los materiales que actúan como disgregantes se han clasificado químicamente como almidones, arcillas, celulosas, alginas o gomas. Otros disgregantes incluyen Veegum HV, metil celulosa, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítrico, polivinilpirrolidona reticulada, carboximetilcelulosa y similares.

10 El término “dispersabilidad” o “dispersable” significa un polvo seco que tiene un contenido de humedad de menos de aproximadamente el 10 % en peso (% p) de agua, habitualmente por debajo de aproximadamente el 5 % p y preferentemente menos de aproximadamente el 3 % p; un tamaño de partícula de aproximadamente 1,0-5,0 µm de diámetro mediano de masas (MMD), habitualmente 1,0-4,0 µm de MMD y preferentemente 1,0-3,0 µm de MMD; una dosis suministrada de aproximadamente > 30 %, habitualmente > 40 %, preferentemente > 50 % y más preferentemente > 60 %; y una distribución de tamaños de partículas de aerosol de 1,0-5,0 µm de diámetro aerodinámico mediano de masas (MMAD), habitualmente 1,5-4,5 µm de MMAD y preferentemente 1,5-4,0 µm de MMAD.

20 El término “seco” significa que la composición tiene un contenido de humedad tal que las partículas son fácilmente dispersables en un dispositivo de inhalación para formar un aerosol. Este contenido de humedad está generalmente por debajo de aproximadamente el 10 % en peso (% p) de agua, habitualmente por debajo de aproximadamente el 5 % p y preferentemente menos de aproximadamente 3 % p.

25 Como se usa en el presente documento, “cantidad eficaz” significa una cantidad de un fármaco o agente farmacológicamente activo que es suficiente para proporcionar el efecto sistémico o local deseado y rendimiento a una relación de beneficio/riesgo razonable que acompaña a cualquier tratamiento médico.

30 Como se usa en el presente documento, los “agentes saporíferos” varían considerablemente en su estructura química, variando de ésteres sencillos, alcoholes y aldehídos hasta carbohidratos y aceites volátiles complejos. Están ahora disponibles sabores sintéticos de casi cualquier tipo deseado.

35 Como se usa en el presente documento, las expresiones “fragmento de una proteína Tf” o “proteína Tf” o “parte de una proteína Tf” se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de una proteína Tf de origen natural o mutante de la misma.

40 Como se usa en el presente documento, el término “gen” se refiere a cualquier segmento de ADN asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen, pero sin limitación, secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los genes también pueden incluir segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Pueden obtenerse genes de diversas fuentes, incluyendo clonando a partir de una fuente de interés o sintetizando a partir de información de secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas para tener parámetros deseados.

45 Como se usa en el presente documento, un “polinucleótido heterólogo” o un “ácido nucleico heterólogo” o un “gen heterólogo” o una “secuencia heteróloga” o un “segmento de ADN hexógeno” se refieren a un polinucleótido, ácido nucleico o segmento de ADN que se origina a partir de una fuente ajena a la célula hospedadora particular, o, si es de la misma fuente, está modificado desde su forma original. Un gen heterólogo en una célula hospedadora incluye un gen que es endógeno de la célula hospedadora particular, pero se ha modificado. Por lo tanto, las expresiones se refieren a un segmento de ADN que es ajeno o heterólogo para la célula, u homólogo de la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en el que el elemento no se encuentra habitualmente. Como ejemplo, una secuencia señal nativa de una célula de levadura pero unida a una secuencia de Tf humana es heteróloga.

55 Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico “aislada” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está esencialmente sin otras secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, al menos aproximadamente 20 % pura, preferentemente al menos aproximadamente 40 % pura, más preferentemente aproximadamente 60 % pura, aún más preferentemente aproximadamente 80 % pura, más preferentemente aproximadamente 90 % pura y aún más preferentemente aproximadamente 95 % pura, como se determina por electroforesis en gel de agarosa. Por ejemplo, puede obtenerse una secuencia de ácido nucleico aislada mediante procedimientos de clonación convencionales usados en ingeniería genética para trasladar la secuencia de ácido nucleico de su localización natural a un sitio diferente en el que se reproducirá. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula vector, e incorporación del vector recombinante en una célula hospedadora en la que se replicarán múltiples copias o clones de la secuencia de ácido

nucleico. La secuencia de ácido nucleico puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, se dice que dos o más secuencias codificantes de ADN están “unidas” o “fusionadas” cuando, como resultado de fusiones en fase entre las secuencias codificantes de ADN, las secuencias codificantes de ADN se traducen en un polipéptido de fusión. El término “fusión” en referencia a fusiones de Tf incluye, pero sin limitación, unión de al menos una proteína, un polipéptido o un péptido terapéutico con el extremo N terminal de Tf, unión con el extremo C terminal de Tf y/o inserción entre dos aminoácidos cualesquiera dentro de Tf.

Como se usa en el presente documento, los “lubricantes” son materiales que realizan varias funciones en la fabricación de comprimidos, tales como mejorar la velocidad del flujo de la granulación del comprimido, evitar la adhesión del material del comprimido a la superficie del troquel y los punzones, reducir la fricción entre partículas y facilitar la eyección de los comprimidos desde la cavidad del troquel. Los lubricantes habitualmente usados incluyen talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico y aceites vegetales hidrogenados. Las cantidades típicas de lubricantes varían de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso.

Como se usa en el presente documento, la “transferrina modificada” como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de transferrina que muestra al menos una modificación de su secuencia de aminoácidos, en comparación con transferrina de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, la “proteína de fusión de transferrina modificada” como se usa en el presente documento se refiere a una proteína formada por la fusión de al menos una molécula de transferrina modificada (o un fragmento o variante de la misma) con al menos una molécula de una proteína terapéutica (o fragmento o variante de la misma).

Como se usa en el presente documento, las expresiones “ácido nucleico” o “polinucleótido” se refieren a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. A no ser que se limiten específicamente, las expresiones abarcan ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a nucleótidos de origen natural. A no ser que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de las mismas (por ejemplo sustituciones de codones degradados) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, pueden conseguirse sustituciones de codones degradados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.* (1991) *Nucleic Acid Res.* 19: 5081; Ohtsuka *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608; Cassol *et al.* (1992); Rossolini *et al.* (1994) *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98). La expresión ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

Como se usa en el presente documento, un segmento de ADN se denomina “unido operativamente” cuando se sitúa en una relación funcional con otro segmento de ADN. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal está unido operativamente con ADN que codifica una proteína de fusión de la invención si se expresa como una preproteína que participa en la secreción de la proteína de fusión; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si estimula la transcripción de la secuencia. En general, las secuencias de ADN que están unidas operativamente son contiguas, y en el caso de una secuencia señal o proteína de fusión tanto contiguas como en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos con las secuencias codificantes cuya transcripción controlan. La unión, en este contexto, se consigue mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes o en adaptadores o enlazadores insertados en lugar de los mismos.

Como se usa en el presente documento, “farmacéuticamente aceptable” se refiere a materiales y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción alérgica o desafortunada similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano. Normalmente, como se usa en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o uno estatal o enumerada en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Como se usa en el presente documento, “cantidad fisiológicamente eficaz” es la cantidad suministrada a un sujeto para proporcionar el efecto paliativo o curativo deseado. Esta cantidad es específica para cada fármaco y su nivel de dosificación aprobado último.

Como se usa en el presente documento, el término “polvo” significa una composición que consiste en partículas sólidas, finamente dispersas, de flujo libre y que pueden dispersarse fácilmente en un dispositivo de inhalación e inhalarse posteriormente por un sujeto de modo que las partículas alcancen los pulmones para permitir la penetración en los alvéolos. Por lo tanto, se dice que el polvo es “respirable”. Preferentemente el tamaño de partícula promedio es menor de aproximadamente 10 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro con una distribución de forma esferoide relativamente uniforme. Más preferentemente el diámetro es menor de aproximadamente 7,5  $\mu\text{m}$  y más preferentemente menor de aproximadamente 5,0  $\mu\text{m}$ . Habitualmente la distribución de tamaños de partículas es

entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, particularmente de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una región de ADN implicada en la unión de ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

5 Como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a una célula, tejido u organismo que ha experimentado transformación con una nueva combinación de genes o ADN.

10 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" puede ser un ser humano, un mamífero o un animal. El sujeto que se trata es un paciente que necesita tratamiento.

15 Como se usa en el presente documento, una entidad de dirección, proteína, polipéptido o péptido se refiere a una molécula que se une específicamente a un tipo celular particular [normal (por ejemplo, linfocitos) o anómalo (por ejemplo, célula cancerosa)] y por lo tanto puede usarse para dirigir una proteína de fusión Tf o compuesto (fármaco o agente citotóxico) a ese tipo celular específicamente.

20 Como se usa en el presente documento, los "comprimidos" son formas de dosificación farmacéutica sólidas que contienen sustancias farmacológicas con o sin diluyentes adecuados y preparados por métodos de compresión o moldeo bien conocidos en la técnica. Los comprimidos se han usado de forma generalizada desde finales del siglo 19 y siguen siendo populares. Los comprimidos siguen siendo populares como una forma de dosificación debido a las ventajas que proporcionan tanto al fabricante (por ejemplo, simplicidad y economía de preparación, estabilidad y conveniencia en su envasado, envío y distribución) como al paciente (por ejemplo, precisión de dosificación, compactibilidad, portabilidad, ausencia de sabor y facilidad de administración). Aunque los comprimidos son más frecuentemente de forma discoide, también pueden ser redondos, ovales, oblongos, cilíndricos o triangulares.

25 Pueden diferir en gran medida en su tamaño y peso dependiendo de la cantidad de sustancia farmacológica presente y el método de administración pretendido. Se dividen en dos clases generales, (1) comprimidos preparados por compresión y (2) comprimidos moldeados o comprimidos triturados. Además del principio o los principios activos o terapéuticos, los comprimidos contienen varios materiales inertes o aditivos. Un primer grupo de dichos aditivos incluye los materiales que ayudan a transmitir características de compresión satisfactorias a la formulación,

30 incluyendo diluyentes, aglutinantes y lubricantes. Un segundo grupo de dichos aditivos ayuda a proporcionar características físicas deseables adicionales al comprimido terminado, tales como disgregantes, colorantes, saporíferos y agentes edulcorantes.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de la proteína de fusión de transferrina que comprende una molécula terapéutica que, cuando se administra a un sujeto que lo necesite, es suficiente para efectuar el tratamiento. La cantidad de proteína de fusión de transferrina que constituye una "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo de la proteína terapéutica usada, la gravedad de la afección o enfermedad, y la edad y el peso corporal del sujeto para tratar, pero puede determinarse de forma rutinaria por un experto en la materia teniendo en cuenta su propio conocimiento y la presente divulgación.

40 Como se usa en el presente documento, "proteína terapéutica" se refiere a proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos o variantes de los mismos, que tienen una o más actividades terapéuticas y/o biológicas. Las proteínas terapéuticas abarcadas por la invención incluyen pero sin limitación proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos y productos biológicos. Los términos péptidos, proteínas y polipéptidos se usan indistintamente en el presente documento. Adicionalmente, la expresión "proteína terapéutica" puede referirse al correlacionado endógeno o de origen natural de una proteína terapéutica. Por un polipéptido que presenta una "actividad terapéutica" o una proteína que es "terapéuticamente activa" se entiende un polipéptido que posee una o más actividades biológicas y/o terapéuticas conocidas asociadas con una proteína terapéutica tal como una o más de las proteínas terapéuticas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica. Como un ejemplo no limitante, una

50 "proteína terapéutica" es una proteína que es útil para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad, afección o trastorno. Dicha enfermedad, afección o trastorno puede ser en seres humanos o en un animal no humano, por ejemplo, uso veterinario.

55 Como se usa en el presente documento, el término "toxina" se refiere a una sustancia tóxica de origen biológico.

60 Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la transferencia de ácido nucleico (es decir, un polímero nucleotídico) a una célula. Como se usa en el presente documento, la expresión "transformación genética" se refiere a la transferencia e incorporación de ADN, especialmente ADN recombinante, a una célula.

65 Como se usa en el presente documento, el término "transformante" se refiere a una célula, tejido u organismo que ha experimentado transformación.

Como se usa en el presente documento, el término "transgén" se refiere a un ácido nucleico que se inserta en un organismo, célula hospedadora o vector de una manera que asegure su función.

Como se usa en el presente documento, el término “transgénico” se refiere a células, cultivos celulares, organismos, bacterias, hongos, animales, plantas y descendencia de cualquiera de los anteriores, que ha recibido un gen ajeno o modificado y en particular un gen que codifica una proteína de fusión de Tf modificada por uno de los diversos métodos de transformación, en los que el gen ajeno o modificado es de la misma especie o una diferente de la especie del organismo que recibe el gen ajeno o modificado.

“Variantes o variante” se refiere a un polinucleótido o ácido nucleico que difiere de un ácido nucleico o polipéptido de referencia, pero que conserva propiedades esenciales del mismo. En general, las variantes son en conjunto estrechamente similares y, en muchas regiones, idénticas al ácido nucleico o polipéptido de referencia. Como se usa en el presente documento, “variante” se refiere a una parte de proteína terapéutica de una proteína de fusión de transferrina de la invención, que difiere en su secuencia de una proteína terapéutica nativa pero que conserva al menos una propiedad funcional y/o terapéutica de la misma como se describe en otra parte en el presente documento o como se conoce de otro modo en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere en general a cualquier plásmido, fagémido o virus que codifica un ácido nucleico exógeno. También debe interpretarse que el término incluye compuestos no plasmídicos, no fagémidos y no virales que facilitan la transferencia del ácido nucleico a viriones o células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina y similares. El vector puede ser un vector viral que es adecuado como un vehículo de suministro para suministro del ácido nucleico, o mutante del mismo, a una célula, o el vector puede ser un vector no viral que es adecuado para el mismo fin. Los ejemplos de vectores virales y no virales para suministro de ADN a células y tejidos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ma *et al.* (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 12744-12746). Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero sin limitación, un virus vaccinia recombinante, un adenovirus recombinante, un retrovirus recombinante, un virus adenoasociado recombinante, un virus de viruela aviar recombinante y similares (Cranage *et al.*, 1986, EMBO J. 5: 3057-3063; Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/17810, publicada el 18 de agosto de 1994; Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/23744, publicada el 27 de octubre de 1994). Los ejemplos de vectores no virales incluyen, pero sin limitación, liposomas, derivados de poliaminas de ADN y similares.

Como se usa en el presente documento, la expresión “tipo silvestre” se refiere a una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que es de origen natural.

### **Transferrina y modificaciones de transferrina**

La presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden una proteína GLP-1 y transferrina modificada. Otras proteínas terapéuticas descritas en el presente documento incluyen IFN- $\beta$ , EMP1 y T-20. En algunos aspectos de la invención, la proteína transferrina que se modifica para su uso en la presente invención es proteína transferrina humana de SEC ID N°: 3. En otros aspectos de la invención, la proteína transferrina que se modifica puede seleccionarse del grupo que consiste en Tf humana (SEC ID N°: 3), Tf de conejo (SEC ID N°: 84), Tf de rata (SEC ID N°: 85), Tf de ratón (SEC ID N°: 86), Tf de caballo (SEC ID N°: 87), Tf bovina (SEC ID N°: 88), Tf de cerdo (SEC ID N°: 89) y Tf de pollo (SEC ID N°: 90). La proteína transferrina modificada se modifica por sustitución, delección o inserción de aminoácidos de entre 1 y 30 aminoácidos.

La Tf humana de tipo silvestre (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos de aproximadamente 75 kDa (sin incluir la glucosilación), con dos dominios principales, N (aproximadamente 330 aminoácidos) y C (aproximadamente 340 aminoácidos), que parece originarse a partir de una duplicación génica. Véase números de referencia de GenBank NM\_001063, XM\_002793, M12530, XM\_039845, XM\_039847 y S95936 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), así como SEC ID N° 1, 2 y 3. Los dos dominios han divergido a lo largo del tiempo pero conservan un alto grado de identidad/similitud (Figura 1).

Cada uno de los dominios N y C se divide adicionalmente en dos subdominios, N1 y N2, C1 y C2. La función de Tf es transportar hierro a las células del cuerpo. Este proceso está mediado por el receptor de Tf (TfR), que se expresa en todas las células, particularmente células con crecimiento activo. TfR reconoce la forma unida a hierro de Tf (de la que dos moléculas están unidas por receptor), se produce entonces endocitosis por la que el complejo de TfR/Tf se transporta al endosoma, momento en el cual la gota localizada en pH da como resultado la liberación de hierro unido y el reciclaje del complejo de TfR/Tf a la superficie celular y la liberación de Tf (conocida como apoTf en su forma no unida a hierro). La unión con el receptor es mediante el dominio C de Tf. No parece que los dos sitios de glucosilación en el dominio C estén implicados en la unión con el receptor ya que Tf unido a hierro no glucosilado se une al receptor.

Cada molécula de Tf puede portar dos iones de hierro ( $Fe^{3+}$ ). Estos están en complejo en el espacio entre los subdominios N1 y N2, C1 y C2 dando como resultado un cambio conformacional en la molécula. Tf cruza la barrera hematoencefálica (BBB) a través del receptor de Tf.

En transferrina humana, los sitios de unión a hierro comprenden al menos los aminoácidos Asp 63 (Asp 82 de SEC ID N°: 2 que incluye la secuencia señal de Tf nativa), Asp 392 (Asp 411 de SEC ID N°: 2), Tyr 95 (Tyr 114 de SEC ID N°: 2), Tyr 426 (Tyr 445 de SEC ID N°: 2), Tyr 188 (Tyr 207 de SEC ID N°: 2), Tyr 514 o 517 (Tyr 533 o Tyr 536 SEC

ID N°: 2), His 249 (His 268 de SEC ID N°: 2), e His 585 (His 604 de SEC ID N°: 2) de SEC ID N°: 3. Las regiones bisagra comprenden al menos los restos de aminoácidos de dominio N 94-96, 245-247 y/o 316-318 así como los restos de aminoácidos del dominio C 425-427, 581-582 y/o 652-658 de SEC ID N°: 3. Los sitios de unión a carbonato comprenden al menos los aminoácidos Thr 120 (Thr 139 de SEC ID N°: 2), Thr 452 (Thr 471 de SEC ID N°: 2), Arg 124 (Arg 143 de SEC ID N°: 2), Arg 456 (Arg 475 de SEC ID N°: 2), Ala 126 (Ala 145 de SEC ID N°: 2), Ala 458 (Ala 477 de SEC ID N°: 2), Gly 127 (Gly 146 de SEC ID N°: 2) y Gly 459 (Gly 478 de SEC ID N°: 2) de SEC ID N°: 3.

La proteína de fusión de transferrina modificada de la invención incluye una transferrina humana modificada, aunque en otros aspectos puede usarse otra molécula de Tf animal para producir las proteínas de fusión de la invención, incluyendo Tf de vaca, cerdo, conejo, rata, ratón y pollo. Todas estas secuencias de Tf están disponibles fácilmente en GenBank y otras bases de datos públicas. La secuencia de nucleótidos de Tf humana está disponible (véase SEC ID N° 1, 2 y 3 y los números de referencia descritos anteriormente disponibles en [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) y puede usarse para realizar fusiones genéticas entre Tf o un dominio de Tf y la molécula terapéutica elegida. También pueden realizarse fusiones a partir de moléculas relacionadas tales como lactotransferrina (lactoferrina) (Referencia de GenBank: NM\_002343) o melanotransferrina (Referencia de GenBank: NM\_013900, melanotransferrina murina).

La melanotransferrina es una proteína glucosilada hallada a altos niveles en células de melanoma malignas y se nombró originalmente antígeno de melanoma humano p97 (Brown *et al.*, 1982, *Nature*, 296: 171-173). Posee una alta homología de secuencia con la transferrina de suero humana, lactoferrina humana y transferrina de pollo (Brown *et al.*, 1982, *Nature*, 296: 171-173; Rose *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 1261-1265). Sin embargo, a diferencia de estos receptores, no se ha identificado ningún receptor celular para melanotransferrina. La melanotransferrina se une de forma reversible al hierro y existe en dos formas, una de las cuales está unida a membranas celulares por un anclaje de glucosil fosfatidilinositol mientras que la otra forma es soluble y se secreta de forma activa (Baker *et al.*, 1992, *FEBS Lett.*, 298: 215-218; Alemany *et al.*, 1993, *J. Cell Sci.*, 104: 1155-1162; Food *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 274: 7011-7017).

Se ha descubierto que la lactoferrina (Lf), una proteína de unión a hierro de defensa natural, posee actividad antibacteriana, antimicótica, antiviral, antineoplásica y antiinflamatoria. La proteína está presente en secreciones exocrinas que se exponen habitualmente a la flora normal: leche, lágrimas, exudado nasal, saliva, mucus bronquial, fluidos gastrointestinales, mucus cervicovaginal y líquido seminal. Adicionalmente, Lf es un constituyente principal de los gránulos específicos secundarios de neutrófilos polimorfonucleares en circulación (PMN). La apoproteína se libera tras la desgranulación de los PMN en áreas sépticas. Una función principal de Lf es la de eliminar hierro libre en fluidos y áreas inflamadas para suprimir daño mediado por radicales libres y reducir la disponibilidad del metal para células microbianas y neoplásicas invasoras. En un estudio que examinó la tasa de renovación de <sup>125</sup>I Lf en adultos, se mostró que Lf se capta rápidamente por el hígado y el bazo, y la radiactividad persistió durante varias semanas en el hígado y el bazo (Bennett *et al* (1979), *Clin. Sci. (Lond.)* 57: 453-460).

La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina descrita en el presente documento incluye una variante de corte y empalme de transferrina. En un ejemplo, una variante de corte y empalme de transferrina puede ser una variante de corte y empalme de transferrina humana. En un ejemplo, la variante de corte y empalme de transferrina humana puede ser la de la Referencia de Genbank AAA61140.

La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina descrita en el presente documento incluye una variante de corte y empalme de lactoferrina. En un ejemplo, una variante de corte y empalme de lactoferrina de suero humano puede ser una nueva variante de corte y empalme de una lactoferrina de neutrófilo. La variante de corte y empalme de lactoferrina de neutrófilo puede ser la de la Referencia de Genbank AAA59479. La variante de corte y empalme de lactoferrina de neutrófilo puede comprender la siguiente secuencia de aminoácidos EDCIALKGEADA (SEC ID N°: 8), que incluye la nueva región de variante de corte y empalme.

La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina descrita en el presente documento puede incluir una variante de melanotransferrina.

Pueden realizarse fusiones de Tf modificadas con cualquier proteína Tf, fragmento, dominio o dominio modificado técnicamente. Por ejemplo, pueden producirse proteínas de fusión usando la secuencia de Tf de longitud completa, con o sin la secuencia señal de Tf nativa. También pueden prepararse proteínas de fusión de Tf usando un único dominio de Tf, tal como un dominio N o C individual o una forma modificada de Tf que comprende dominios 2N o 2C (véase Solicitud Provisional de Estados Unidos 60/406.977, presentada el 30 de agosto de 2002).

En algunos ejemplos, pueden producirse fusiones de una proteína terapéutica con un único dominio C, en las que el dominio C se altera para reducir, inhibir o prevenir la glucosilación. En otros ejemplos, el uso de un único dominio N es ventajoso ya que los sitios de glucosilación de Tf residen en el dominio C y el dominio N, por sí solos. Un ejemplo preferido es la proteína de fusión de Tf que tiene un único dominio N que se expresa a alto nivel.

5 Como se usa en el presente documento, un dominio o lóbulo C terminal modificado para actuar como un dominio de tipo T se modifica para mostrar patrones de glucosilación o propiedades de unión a hierro sustancialmente similares a las de un dominio o lóbulo N nativo o de tipo silvestre. En un ejemplo preferido, el dominio o lóbulo C se modifica de modo que no esté glucosilado y no se una con hierro por sustitución de las regiones o aminoácidos de dominio C relevantes con los presentes en las regiones o sitios correspondientes de un dominio N nativo o de tipo silvestre.

10 Como se usa en el presente documento, un resto Tf que comprende “dos dominios o lóbulos N” incluye una molécula de Tf que se modifica para reemplazar el dominio o lóbulo C nativo con un dominio o lóbulo N nativo de tipo silvestre o un dominio o lóbulo N modificado o contiene un dominio C que se ha modificado para actuar sustancialmente como un dominio N de tipo silvestre o modificado.

15 El análisis de los dos dominios por superposición de los dos dominios (Swiss PDB Viewer 3.7b2, Iterative Magic Fit) y por alineamiento de aminoácidos directo (alineamiento múltiple ClustalW) revela que los dos dominios han divergido a lo largo del tiempo. El alineamiento de aminoácidos muestra 42 % de identidad y 59 % de similitud entre los dos dominios. Sin embargo, aproximadamente el 80 % del dominio N coincide con el dominio C para equivalencia estructural. El dominio C también tiene varios enlaces disulfuro extra en comparación con el dominio N.

El alineamiento de modelos moleculares para el dominio N y C revela los siguientes equivalentes estructurales:

Dominio N (1-330)	4-24	36-72 75-88	94-136	138-139	149-164	168-173	178-198 200-214	219-255	259-260	263-268	271-275	279-280	283-288 290-304	309-327
	Dominio C (340-679)	340-361	365-415	425-437 439-468	470-471	475-490	492-497	507-542	555-591	593-594	597-602	605-609	614-615	620-640

Los enlaces disulfuro para los dos dominios se alinean de la siguiente manera:

N	C	
	<i>C339-C596</i>	
<b>C9-C48</b>	<b>C345-C377</b>	
<b>C19-C39</b>	<b>C355-C368</b>	Negrita enlaces disulfuro alineados
	<i>C402-C674</i>	<i>Cursiva</i> péptido de enlace
	<i>C418-C637</i>	
<b>C118-C194</b>	<b>C450-C523</b>	
<i>C137-C331</i>		
	<i>C474-C665</i>	
<b>C158-C174</b>	<b>C484-C498</b>	
<i>C161-C179</i>		
<b>C171-C177</b>	<b>C495-C506</b>	
<b>C227-C241</b>	<b>C563-C577</b>	
	<i>C615-C620</i>	

5 La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir al menos dos lóbulos N terminales de transferrina. La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir al menos dos lóbulos N terminales de transferrina derivada de transferrina de suero humano.

10 La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir, comprender o consistir en al menos dos lóbulos N terminales de transferrina que tienen una mutación en al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp63, Gly65, Tyr95, Tyr188 e His249 de SEC ID N°: 3.

15 En una realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina modificada incluye un lóbulo N terminal de transferrina de suero humano recombinante mutante que tiene una mutación en Lys206 o His207 de SEC ID N°: 3.

La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir, comprender o consistir en al menos dos lóbulos C terminales de transferrina.

20 La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir al menos dos lóbulos C terminales de transferrina derivada de transferrina de suero humano.

El mutante de lóbulo C terminal puede incluir además una mutación de al menos uno de Asn413 y Asn611 de SEC ID N°: 3 que no permite glucosilación.

25 La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir al menos dos lóbulos C terminales de transferrina que tiene una mutación en al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp392, Tyr426, Tyr514, Tyr517 e His585 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante conserva la capacidad para unirse con metal. Como alternativa, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir al menos dos lóbulos C terminales de transferrina que tienen una mutación en al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr426, Tyr514, Tyr517 e His585 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante tiene una capacidad reducida para unirse con metal.

35 La parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina puede incluir al menos dos lóbulos C terminales de transferrina que tienen una mutación en al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp392, Tyr426, Tyr517 e His585 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante no conserva la capacidad para unirse con metal y actúa sustancialmente como un dominio N.

40 La Tf o parte Tf será de suficiente longitud para aumentar la semivida en circulación *in vivo*, estabilidad en suero, estabilidad de solución *in vitro* o biodisponibilidad de la proteína o el péptido terapéutico o receptor de toxina soluble en comparación con la semivida en circulación *in vivo*, la estabilidad en suero, la estabilidad de solución *in vitro* o biodisponibilidad de la proteína o el péptido terapéutico o receptor de toxina soluble en un estado no fusionado. Dicho aumento en la estabilidad, semivida en suero o biodisponibilidad puede ser de aproximadamente 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de aumento sobre la proteína o el péptido terapéutico no fusionado o receptor de toxina soluble. En algunos casos, las proteínas de fusión de transferrina que comprenden transferrina modificada muestran una semivida en suero de aproximadamente 10-20 o más días, aproximadamente 12-18 días o aproximadamente 45 14-17 días.

Quando el dominio C de Tf es parte de la proteína de fusión, los dos sitios de glucosilación ligados a N, restos de aminoácidos correspondientes a N413 y N611 de SEC ID N°: 3 pueden mutarse para expresión en un sistema de levadura para evitar la glucosilación o hipermanosilación y extender la semivida en suero de la proteína de fusión y/o proteína terapéutica (para producir asialo, o en algunos casos, monosialo Tf o disialo Tf). Además de aminoácidos de Tf correspondientes a N413 y N611, puede haber mutaciones de los restos adyacentes dentro del sitio de glucosilación N-X-S/T para prevenir o reducir sustancialmente la glucosilación. Véase Patente de Estados Unidos 5.986.067 de Funk *et al.* También se ha indicado que el dominio N de Tf expresado en *Pichia pastoris* se vuelve glucosilado ligado a O con una única hexosa en S32 que también puede mutarse o modificarse para evitar dicha glucosilación.

En consecuencia, en una realización de la invención, la proteína de fusión de transferrina incluye una molécula de transferrina modificada en la que la transferrina muestra glucosilación reducida, incluyendo pero sin limitación formas asialo, monosialo y disialo de Tf. En otra realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que está mutado para evitar la glucosilación. En otra realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que está completamente glucosilado. En una realización adicional, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina de suero humano recombinante que está mutado para evitar la glucosilación, en el que al menos uno de Asn413 y Asn611 de SEC ID N°: 3 están mutados a un aminoácido que no permite la glucosilación. En otra realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina de suero humano recombinante que está mutado para evitar o reducir sustancialmente la glucosilación, en el que puede haber mutaciones de los restos adyacentes dentro del sitio de glucosilación N-X-S/T. Además, la glucosilación puede reducirse o prevenirse mutando el resto de serina o treonina. Además, se sabe que el cambio de X a prolina inhibe la glucosilación.

Como se analiza en más detalle posteriormente, las proteínas de fusión de Tf modificadas de la invención también pueden modificarse técnicamente para no unirse con hierro y/o unirse con el receptor de Tf. En otras realizaciones de la invención, la unión con hierro se conserva y la capacidad de unión con hierro de Tf puede usarse para suministrar una proteína o un péptido o péptidos de GLP-1 al interior de una célula, a través de una membrana de célula epitelial o endotelial y/o a través de la BBB. Estas realizaciones que se unen con hierro y el receptor de Tf se modificarán técnicamente para reducir o evitar la glucosilación para extender la semivida en suero de la proteína GLP-1. El dominio N solo no se unirá a TfR cuando esté cargado con hierro, y el dominio C unido a hierro se unirá con TfR pero no con la misma afinidad que la molécula completa.

En otra realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante no conserva la capacidad de unirse con iones metálicos. En una realización alternativa, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante tiene una avidez de unión más débil para iones metálicos que la transferrina en suero de tipo silvestre. En una realización alternativa, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante tiene una avidez de unión más fuerte para iones metálicos que la transferrina de suero de tipo silvestre.

En otra realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante no conserva la capacidad de unirse con el receptor de transferrina. En una realización alternativa, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante tiene una avidez de unión más débil para el receptor de transferrina que la transferrina de suero de tipo silvestre. En una realización alternativa, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante tiene una avidez de unión más fuerte para el receptor de transferrina que la transferrina de suero de tipo silvestre.

También se describe en el presente documento un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante no conserva la capacidad de unirse con iones de carbonato. En un ejemplo alternativo, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante tiene una avidez de unión más débil para iones de carbonato que la transferrina de suero de tipo silvestre. En un ejemplo alternativo, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina recombinante que tiene una mutación en la que el mutante tiene una avidez de unión más fuerte para iones de carbonato que la transferrina de suero de tipo silvestre.

En otra realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina de suero humano recombinante que tiene una mutación en al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp63, Gly65, Tyr95, Tyr188, His249, Asp392, Tyr426, Tyr514, Tyr517 y His585 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante conserva la capacidad de unirse con iones metálicos. En una realización alternativa, un mutante de transferrina de suero humano recombinante que tiene una mutación en al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp63, Gly65, Tyr95, Tyr188, His249, Asp392, Tyr426, Tyr514, Tyr517 y His585 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante tiene una capacidad reducida para unirse con iones metálicos. En otra

realización, un mutante de transferrina de suero humano recombinante que tiene una mutación en al menos un resto de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en Asp63, Gly65, Tyr95, Tyr188, His249, Asp392, Tyr426, Tyr517 y His585 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante no conserva la capacidad de unirse a iones metálicos.

- 5 En otra realización, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina de suero humano recombinante que tiene una mutación en Lys206 o His207 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante tiene una avidez de unión más fuerte para iones metálicos que la transferrina de suero humano de tipo silvestre (véase Patente de Estados Unidos 5.986.067).
- 10 En una realización alternativa, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluye un mutante de transferrina de suero humano recombinante que tiene una mutación en Lys206 o His207 de SEC ID N°: 3, en el que el mutante tiene una avidez de unión más débil para iones metálicos que la transferrina de suero humano de tipo silvestre. En una realización adicional, la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina incluyen un mutante de transferrina de suero humano recombinante que tiene una mutación en Lys206 o His207 de SEC ID N°:
- 15 3, en el que el mutante no se une a iones metálicos.

Puede usarse cualquier técnica disponible para producir las proteínas de fusión de transferrina de la invención, incluyendo pero sin limitación técnicas moleculares disponibles habitualmente, por ejemplo, las desveladas en Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

20 Cuando se llevan a cabo sustituciones de nucleótidos usando técnicas para conseguir mutagénesis específica de sitio que se conocen bien en este campo, los cambios de aminoácidos codificados son preferentemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas, aunque se contemplan también otras sustituciones, no conservativas, particularmente cuando se produce una parte de transferrina modificada de una proteína de fusión de Tf, por ejemplo, una proteína Tf modificada que muestra glucosilación reducida, unión a hierro

25 reducida y similares. Específicamente se contemplan sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; inserciones entre dominios de transferrina; extensiones amino o carboxilo terminales pequeñas, tales como un resto de metionina amino terminal, o péptidos enlazadores pequeños de menos de 50, 40, 30, 20 o 10 restos entre dominios de transferrina o que unen una proteína de transferrina y proteína terapéutica o péptido o receptor de toxina soluble o una extensión pequeña que

30 facilita la purificación, tal como un tramo de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

Son ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservativas las sustituciones realizadas dentro del mismo grupo tal como dentro del grupo de aminoácidos básicos (tal como arginina, lisina, histidina) aminoácidos ácidos (tales como ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (tal como glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos

35 (tal como leucina, isoleucina, valina), aminoácidos aromáticos (tales como fenilalanina, triptófano, tirosina) y aminoácidos pequeños (tales como glicina, alanina, serina, treonina, metionina).

Las sustituciones no conservativas abarcan sustituciones de aminoácidos en un grupo por aminoácidos en otro grupo. Por ejemplo, una sustitución no conservativa incluiría la sustitución con un aminoácido polar de un aminoácido hidrófobo. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase por ejemplo Ford *et al.* (1991), Prot. Exp. Pur. 2: 95-107. Las sustituciones, deleciones e inserciones no conservativas son particularmente útiles para producir proteínas de fusión de Tf de la invención que no muestran unión o muestran unión reducida de

40 hierro, no muestran unión o muestran unión reducida de la proteína de fusión con el receptor de Tf y/o no muestran glucosilación o muestran glucosilación reducida.

La unión a hierro y/o unión a receptor puede reducirse o alterarse por mutación, incluyendo delección, sustitución o inserción en restos de aminoácidos correspondientes a uno o más de los restos de dominio N de Tf Asp63, Tyr95, Tyr188, His249 y/o restos de dominio C Asp 392, Tyr 426, Tyr 514 y/o His 585 de SEC ID N°: 3. La unión a hierro

50 también puede verse afectada por la mutación a aminoácidos Lys206, His207 o Arg632 de SEC ID N°: 3. La unión a carbonato puede reducirse o alterarse por mutación, incluyendo delección, sustitución o inserción en restos de aminoácidos correspondientes a uno o más de los restos de dominio N de Tf Thr120, Arg124, Ala126, Gly 127 y/o restos de dominio C Thr 452, Arg 456, Ala 458 y/o Gly 459 de SEC ID N°: 3. Una reducción o alteración de la unión a carbonato puede afectar de forma adversa a la unión a hierro y/o receptor.

55 La unión a receptor de Tf puede reducirse o alterarse por mutación, incluyendo delección, sustitución o inserción en restos de aminoácidos correspondientes a uno o más de los restos de dominio N de Tf descritos anteriormente para unión a hierro.

Como se ha analizado anteriormente, la glucosilación puede reducirse o prevenirse por mutación, incluyendo delección, sustitución o inserción en restos de aminoácidos correspondientes a uno o más de los restos de dominio C de Tf alrededor de los sitios N-X-S/T correspondientes a los restos de dominio C N413 y/o N611 (Véase Patente de Estados Unidos N° 5.986.067). Por ejemplo, el N413 y/o N611 puede mutarse a restos de Glu.

60

En casos en los que las proteínas de fusión de Tf descritas en el presente documento no se modifican para prevenir la glucosilación, unión a hierro, unión a carbonato y/o unión a receptor, glucosilación, los iones de hierro y/o carbonato pueden extraerse de o escindir de la proteína de fusión. Por ejemplo, pueden usarse desglucosilasas

65

disponibles para escindir restos de glucosilación de la proteína de fusión, en particular los restos de azúcar añadidos a la parte Tf, puede usarse levadura deficiente en enzimas de glucosilación para evitar la glucosilación y/o pueden cultivarse células recombinante en presencia de un agente que evite la glucosilación, por ejemplo, tunicamicina.

5 Los carbohidratos en la proteína de fusión también pueden reducirse o retirarse completamente de forma enzimática tratando la proteína de fusión con desglucosilasas. Las desglucosilasas se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de desglucosilasas incluyen pero sin limitación galactosidasa, PNGasa A, PNGasa F, glucosidasa, manosidasa, fucosidasa y Endo H desglucosilasa.

10 No obstante, en ciertas circunstancias, puede ser preferible para el suministro oral que la parte de Tf de la proteína de fusión esté completamente glucosilada.

Pueden realizarse mutaciones adicionales con Tf para alterar la estructura tridimensional de Tf, tales como modificaciones de la región bisagra para evitar el cambio conformacional necesario para unión a hierro y reconocimiento del receptor de Tf. Por ejemplo, pueden realizarse mutaciones en o en torno a los restos de aminoácidos de dominio N 94-96, 245-247 y/o 316-318 así como restos de aminoácidos del dominio C 425-427, 581-582 y/o 652-658. Además, pueden realizarse mutaciones en o alrededor de las regiones flanqueantes de estos sitios para alterar la estructura y función de Tf.

20 En un aspecto de la invención, la proteína de fusión de transferrina puede actuar como una proteína vehículo para extender la semivida o biodisponibilidad de la proteína terapéutica así como, en algunos casos, suministrar la proteína terapéutica dentro de una célula y/o a través de la barrera hematoencefálica. En una realización alternativa, la proteína de fusión de transferrina incluye una molécula de transferrina modificada en la que la transferrina no conserva la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.

25 En otra realización, la proteína de fusión de transferrina incluye una molécula de transferrina modificada en la que la molécula de transferrina conserva la capacidad para unirse con el receptor de transferrina y transportar el péptido terapéutico al interior de células. En una realización alternativa, la proteína de fusión de transferrina incluye una molécula de transferrina modificada en la que la molécula de transferrina no conserva la capacidad para unirse con el receptor de transferrina y transportar el péptido terapéutico al interior de las células.

30 En realizaciones adicionales, la proteína de fusión de transferrina incluye una molécula de transferrina modificada en la que la molécula de transferrina conserva la capacidad para unirse con el receptor de transferrina y transportar el péptido terapéutico al interior de células y conserva la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. En una realización alternativa, la proteína de fusión de transferrina incluye una molécula de transferrina modificada en la que la molécula de transferrina conserva la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, pero no conserva la capacidad para unirse con el receptor de transferrina y transportar el péptido terapéutico al interior de células.

#### **Proteínas de fusión de transferrina modificadas**

40 La fusión de proteínas de la invención puede contener una o más copias de la proteína GLP-1 o el polipéptido unido al extremo N terminal y/o el C terminal de la proteína Tf. En algunas realizaciones, la proteína o el polipéptido GLP-1 está unido a los extremos tanto N como C terminal de la proteína Tf y la proteína de fusión puede contener una o más moléculas de GLP-1 en uno o ambos extremos de Tf. En otras realizaciones, la proteína o polipéptido GLP-1 se inserta en dominios conocidos de la proteína Tf, por ejemplo, en uno o más de los bucles de Tf (véase Ali *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274(34): 24066-24073). De hecho, la proteína o el polipéptido GLP-1 puede insertarse en los cinco bucles de transferrina para crear una molécula pentavalente con avidéz aumentada para el antígeno, receptor o molécula de dirección, al que se une la proteína GLP-1. En otras realizaciones, la proteína o el polipéptido GLP-1 se inserta entre los dominios N y C de Tf. Como alternativa, la proteína o el polipéptido terapéutico se inserta en cualquier parte en la molécula de transferrina.

50 En general, la proteína de fusión de transferrina de la invención puede tener una región derivada de transferrina modificada y una región proteica terapéutica. Pueden usarse múltiples regiones de cada proteína, sin embargo, para preparar una proteína de fusión de transferrina de la invención. De forma similar, puede usarse más de una proteína terapéutica para preparar una proteína de fusión de transferrina de la invención, produciendo de este modo una proteína de fusión de Tf modificada multifuncional.

60 En una realización, la proteína de fusión de transferrina de la invención contiene una molécula de GLP-1 fusionada con una proteína de transferrina modificada. En otra realización, la proteína de fusión de transferrina de la invención contiene una proteína o un polipéptido GLP-1 fusionado con el extremo N terminal de una molécula de transferrina modificada. En una realización alternativa, la proteína de fusión de transferrina de la invención contiene una proteína o un polipéptido GLP-1 fusionado con el extremo C terminal de una molécula de transferrina modificada. En una realización adicional, la proteína de fusión de transferrina de la invención contiene una molécula de transferrina modificada fusionada con el extremo N terminal de una proteína o un polipéptido GLP-1. En una realización alternativa, la proteína de fusión de transferrina de la invención contiene una molécula de transferrina modificada fusionada con el extremo C terminal de una proteína o un polipéptido GLP-1.

En otras realizaciones, la proteína de fusión de transferrina de la invención contiene una proteína de GLP-1 fusionada tanto con el extremo N terminal como con el extremo C terminal de transferrina modificada. También se describen en el presente documento proteínas terapéuticas fusionadas en los extremos N y C terminales que se unen con las mismas proteínas terapéuticas. Las proteínas terapéuticas fusionadas en los extremos N y C terminales pueden ser proteínas terapéuticas diferentes. Las proteínas terapéuticas fusionadas con los extremos N y C terminales pueden unirse con diferentes proteínas terapéuticas que pueden usarse para tratar o prevenir la misma enfermedad, el mismo trastorno o la misma afección. Las proteínas terapéuticas fusionadas con los extremos N y C terminales pueden ser proteínas terapéuticas diferentes que pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se sabe en la técnica que aparecen habitualmente en paciente simultáneamente.

Además de la proteína de fusión de transferrina modificada de la invención en la que la parte de transferrina modificada está fusionada con el extremo N terminal y/o C terminal de la parte de proteína GLP-1, la proteína de fusión de transferrina de la invención también puede producirse insertando la molécula de GLP-1 en una región interna de la transferrina modificada. Las regiones internas de la transferrina modificada incluyen, pero sin limitación, los sitios de unión a hierro, las regiones bisagra, los sitios de unión a bicarbonato o el dominio de unión a receptor.

Dentro de la secuencia proteica de la molécula de transferrina modificada existen varios bucles o giros, que se estabilizan por enlaces disulfuro. Estos bucles son útiles para la inserción, o fusión interna, de péptidos terapéuticamente activos particularmente los que requieren que una estructura secundaria sea funcional, o proteínas terapéuticas para generar una molécula de transferrina modificada con actividad biológica específica.

Cuando se insertan proteínas terapéuticas en o reemplazan al menos un bucle de una molécula de Tf, pueden realizarse inserciones dentro de cualquiera de las regiones de bucle expuestas en superficie, además de otras áreas de Tf. Por ejemplo, pueden realizarse inserciones dentro de los bucles que comprenden los aminoácidos de Tf 32-33, 74-75, 256-257, 279-280 y 288-289 (Ali *et al.*, mencionado anteriormente) (Véase Figura 3). Como se ha descrito previamente, también pueden realizarse inserciones dentro de otras regiones de Tf tales como los sitios para unión a hierro y bicarbonato, regiones bisagra, y el dominio de unión a receptor como se describe en más detalle posteriormente. Los bucles en la secuencia de proteína de Tf que son susceptibles de modificación/reemplazo para la inserción de proteínas o péptidos también pueden usarse para el desarrollo de una biblioteca explorable de insertos peptídicos aleatorios. Puede usarse cualquier procedimiento para producir insertos de ácido nucleico para la generación de bibliotecas de péptidos, incluyendo sistemas de presentación bacteriana y en fagos disponible, antes de clonar en un dominio de Tf y/o fusión con los extremos de Tf.

El extremo N terminal de Tf está libre y apunta fuera del cuerpo de la molécula. Las fusiones de proteínas o péptidos en el extremo N terminal pueden por lo tanto ser una realización preferida. Dichas fusiones pueden incluir una región enlazadora, tal como pero sin limitación un tramo de poliglicina, para separar la proteína terapéutica de Tf. La atención al punto de unión entre la secuencia líder, la elección de secuencia líder y la estructura del ARNm por manipulación/optimización de codones (sin bucles de tallo principal para inhibir el progreso del ribosoma) aumentarán la secreción y puede conseguirse fácilmente usando técnicas de proteínas recombinantes convencionales.

El extremo C terminal de Tf parece estar más interno y fijado por 6 aminoácidos con enlaces disulfuro del extremo C terminal. En Tf humana, el aminoácido C terminal es una prolina que, dependiendo del modo en que se oriente, apuntará a una fusión fuera o dentro del cuerpo de la molécula. Puede usarse un resto enlazador o espaciador en el extremo C terminal en algunas realizaciones de la invención. También hay una prolina cerca del extremo N terminal. En un aspecto de la invención, la prolina en los extremos N y/o C terminales pueden cambiarse. En otro aspecto de la invención, el enlace disulfuro C terminal puede eliminarse para separar el extremo C terminal.

Las moléculas pequeñas terapéuticas pueden formar complejo con el hierro y cargarse en una fusión de proteína Tf modificada para suministro al interior de células y a través de la BBB. La adición de un péptido de dirección o, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario (SCA) puede usarse para dirigir la carga a un tipo celular particular, por ejemplo, una célula cancerosa.

#### Proteínas y péptidos terapéuticos

Aunque la invención se refiere a GLP-1 como la proteína terapéutica, puede usarse cualquier molécula terapéutica como el compañero de fusión de Tf. Como se usa en el presente documento, una molécula terapéutica es normalmente una proteína o un péptido capaz de ejercer un efecto biológico beneficioso *in vitro* o *in vivo* e incluye proteínas o péptidos que ejercen un efecto beneficioso en relación con homeostasis normal, fisiología o una patología. Las moléculas terapéuticas no incluyen compañeros de fusión habitualmente usados como marcadores o adyuvantes de purificación de proteínas, tales como galactosidasas bacterianas (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.986.067 y Aldred *et al.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 960-965). Por ejemplo, un efecto beneficioso en relación con una patología incluye cualquier efecto que sea ventajoso para el sujeto tratado, incluyendo prevención de enfermedades, estabilización de enfermedades, la reducción o alivio de síntomas de enfermedad o una modulación, alivio o cura del defecto subyacente para producir un efecto beneficioso para el sujeto tratado.

Una proteína de fusión de transferrina modificada de la invención incluye al menos una molécula de GLP-1 y al menos un fragmento o variante de transferrina de suero modificada, como se expone en las reivindicaciones, que se asocian entre sí, preferentemente por fusión genética.

5 La proteína de fusión de transferrina puede incluir una molécula de transferrina modificada unida con un agente neurofarmacéutico. La proteína de fusión de transferrina modificada puede incluir transferrina en el extremo carboxilo terminal unida a un agente neurofarmacéutico en el extremo amino terminal. Como alternativa, la proteína de fusión de transferrina modificada puede incluir transferrina en el extremo amino terminal unida con un agente neurofarmacéutico en el extremo carboxilo terminal. Preferentemente, el agente neurofarmacéutico es el factor de crecimiento nervioso o el factor neurotrófico ciliar.

15 Como se describe en el presente documento, una proteína de fusión de transferrina modificada puede contener al menos un fragmento o variante de una proteína terapéutica. En un ejemplo adicional, las proteínas de fusión de transferrina pueden contener fragmentos peptídicos o variantes peptídicas de proteínas o anticuerpos en los que la variante o fragmento conserva al menos una actividad biológica o terapéutica. Las proteínas de fusión de transferrina pueden contener proteínas terapéuticas que pueden ser fragmentos peptídicos o variantes peptídicas de al menos aproximadamente 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, o al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 55, al menos aproximadamente 60 o al menos aproximadamente 70 o más aminoácidos de longitud fusionados con el extremo N y/o C terminal, insertados dentro de, o insertados en un bucle de una transferrina modificada.

25 Las proteínas de fusión de transferrina modificadas pueden contener uno o más péptidos. Aumentar el número de péptidos potencia la función de los péptidos fusionados con transferrina y la función de la proteína de fusión de transferrina completa. Los péptidos pueden usarse para realizar una proteína de fusión bi o multifuncional incluyendo dominios peptídicos o proteicos con múltiples funciones. Por ejemplo, puede prepararse una proteína de fusión multifuncional con una proteína terapéutica y una segunda proteína para dirigir la proteína de fusión a una diana específica. Otros péptidos pueden usarse para inducir la respuesta inmunitaria de un sistema celular, o inducir una respuesta antiviral, antibacteriana o antipatógena.

30 Las moléculas de fusión de transferrina modificadas pueden contener una parte proteica terapéutica que puede ser fragmentos de una proteína terapéutica que incluya la proteína de longitud completa así como polipéptidos que tengan uno o más restos suprimidos del extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos.

35 Las moléculas de fusión de transferrina modificadas pueden contener una parte proteica terapéutica que puede ser fragmentos de una proteína terapéutica que incluya la proteína de longitud completa así como polipéptidos que tengan uno o más restos suprimidos del extremo carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos.

40 Las moléculas de fusión de transferrina modificadas pueden contener una parte proteica terapéutica que puede tener uno o más aminoácidos suprimidos de los extremos tanto amino como carboxilo terminales.

45 Las moléculas de fusión de transferrina modificadas pueden contener una parte proteica terapéutica que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una proteína terapéutica de referencia expuesta en el presente documento, o fragmentos de la misma. Las moléculas de fusión de transferrina pueden contener una parte proteica terapéutica que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a polipéptidos de referencia que tienen la secuencia de aminoácidos de deleciones N y C terminales como se ha descrito anteriormente.

50 Las moléculas de fusión de transferrina modificadas pueden contener la parte proteica terapéutica que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, idéntica a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos nativa o de tipo silvestre de una proteína terapéutica. También se proporcionan fragmentos de estos polipéptidos.

55 Las proteínas terapéuticas correspondientes a una parte proteica terapéutica de una proteína de fusión de transferrina modificada, tales como las proteínas de superficie celular y secretoras, pueden modificarse mediante la unión de uno o más grupos de oligosacáridos. La modificación denominada glucosilación puede afectar significativamente a las propiedades físicas de las proteínas y puede ser importante en la estabilidad, secreción y localización de proteínas. Se produce glucosilación en localizaciones específicas a lo largo de la cadena principal polipeptídica. Hay habitualmente dos tipos principales de glucosilación: glucosilación caracterizada por oligosacáridos ligados a O, que se unen a restos de serina o treonina; y glucosilación caracterizada por oligosacáridos ligados a N, que se unen a restos de asparagina en una secuencia Asn-X-Ser/Thr, en la que X puede ser un aminoácido excepto prolina. Variables tales como la estructura proteica y el tipo celular influyen en el número y la naturaleza de las unidades de carbohidratos dentro de las cadenas en diferentes sitios de glucosilación. También son comunes isómeros de glucosilación en el mismo sitio dentro de un tipo celular dado. Por ejemplo, 65 varios tipos de interferón humano están glucosilados.

5 Proteínas terapéuticas correspondientes a una parte proteica terapéutica de una proteína de fusión de transferrina, así como análogos y variantes de la misma, pueden modificarse de modo que se altere la glucosilación en uno o más sitios como resultado de la manipulación o manipulaciones de su secuencia de ácido nucleico por la célula hospedadora en la que se expresan, o debido a otras condiciones de su expresión. Por ejemplo, pueden producirse isómeros de glucosilación anulando o introduciendo sitios de glucosilación, por ejemplo, por sustitución o delección de restos de aminoácidos, tal como sustitución de asparagina por glutamina, o pueden producirse proteínas recombinantes no glucosiladas expresando las proteínas en células hospedadoras que no las glucosilarán, por ejemplo en levadura deficiente en glucosilación. Estos enfoques se conocen en la técnica.

10 Se conocen bien en la técnica proteínas terapéuticas y sus secuencias de ácido nucleico y están disponibles en bases de datos públicas tales como las bases de Datos de Chemical Abstracts Services (por ejemplo, el Registro de CAS), GenBank y GenSeq.

15 En otras realizaciones, las proteínas de fusión de transferrina de la invención tienen capacidad para una actividad terapéutica y/o actividad biológica, correspondiente a la actividad terapéutica y/o actividad biológica de la proteína terapéutica descrita en otra parte de la presente solicitud.

20 La presente divulgación se refiere además a proteínas de fusión de Tf modificadas que comprenden fragmentos de las proteínas GLP-1 descritas en el presente documento. Incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N terminal de una proteína da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas de la parte proteica terapéutica, aún pueden conservarse otras actividades terapéuticas y/o actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas, capacidad de multimerizar, capacidad de unirse con un ligando). Por ejemplo, la capacidad de los polipéptidos con delecciones N terminales de inducir y/o unirse con anticuerpos que reconozcan las formas completas o maduras de los polipéptidos se conservarán en general con menos de la mayoría de los restos del polipéptido completo retirado del extremo N terminal. Si un polipéptido particular que carece de restos N terminales de un polipéptido completo conserva dichas actividades inmunológicas puede ensayarse por métodos rutinarios descritos en el presente documento y conocidos de otro modo en la técnica. No es poco probable que un mutante con un gran número de restos de aminoácidos N terminales suprimidos pueda conservar alguna actividad biológica o inmunogénica. De hecho, los péptidos compuestos de tan poco como seis restos de aminoácidos pueden con frecuencia inducir una respuesta inmunitaria.

35 También como se ha mencionado anteriormente, incluso si la supresión de uno o más aminoácidos del extremo N terminal o C terminal de una proteína terapéutica da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas de la proteína, otras actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas, capacidad de multimerizar, capacidad de unirse con un ligando) y/o actividades terapéuticas aún pueden conservarse. Por ejemplo, se conservará la capacidad de los polipéptidos con delecciones C terminales para inducir y/o unirse con anticuerpos que reconocen las formas completas o maduras del polipéptido en general cuando se retire menos de la mayoría de los restos del polipéptido completo o maduro del extremo C terminal. Si un polipéptido particular que carece de restos N terminales y/o C terminales de un polipéptido de referencia conserva actividad terapéutica puede determinarse fácilmente mediante métodos rutinarios descritos en el presente documento y/o conocidos de otro modo en la técnica.

45 Los fragmentos peptídicos de las proteínas terapéuticas pueden ser fragmentos que comprenden, o como alternativa, que consisten en, una secuencia de aminoácidos que presenta una actividad terapéutica y/o actividad funcional (por ejemplo, actividad biológica de la secuencia polipeptídica de la proteína terapéutica de la que la secuencia de aminoácidos es un fragmento).

50 Los fragmentos peptídicos de la proteína terapéutica pueden comprender solamente los extremos N y C terminales de la proteína, es decir, la parte central de la proteína terapéutica se ha suprimido. Como alternativa, los fragmentos peptídicos pueden comprender partes no adyacentes y/o adyacentes de la parte central de la proteína terapéutica.

55 Otros fragmentos polipeptídicos son fragmentos biológicamente activos. Son fragmentos biológicamente activos los que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de una proteína terapéutica descrita en el presente documento. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una actividad deseada mejorada, o una actividad indeseable reducida.

60 En general, las variantes de proteínas son en conjunto muy similares y, en muchas regiones, idénticas a la secuencia de aminoácidos de la proteína terapéutica correspondiente a una parte proteica terapéutica de una proteína de fusión de transferrina descrita en el presente documento. También se describen en el presente documento ácidos nucleicos que codifican estas variantes.

65 Son polipéptidos terapéuticos adicionales que pueden usarse polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con el complemento de una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína terapéutica en condiciones de hibridación rigurosas que se conocen por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, eds., 1989 Current protocol in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons Inc., Nueva York).

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente invención, se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia de consulta excepto que la secuencia polipeptídica objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de consulta, hasta el 5 % de los restos de aminoácidos en la secuencia objeto pueden insertarse, suprimirse o sustituirse con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre restos en la secuencia de referencia, o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

De manera práctica, si cualquier polipéptido particular es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de transferrina de la invención o un fragmento de la misma (tal como la parte proteica terapéutica de la proteína de fusión de transferrina o la parte de transferrina de la proteína de fusión de transferrina), puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia general entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominado alineamiento de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brufiga *et al.* (Comp. App. Biosci 245 (1990)).

Las variantes polinucleotídicas pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Pueden usarse variantes polinucleotídicas que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado para producir proteínas de fusión de Tf modificadas. Pueden utilizarse variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Además, también pueden utilizarse variantes polipeptídicas en las que menos de aproximadamente 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10, o 5-50, 5-25, 5-10, 1-5, o 1-2 aminoácidos se sustituyen, suprimen o añaden en cualquiera combinación. Pueden producirse variantes polinucleotídicas por diversas razones, por ejemplo, para optimizar la expresión codónica para un hospedador particular (cambiar codones en el ARNm humano a los preferidos por un hospedador, tal como levadura o *E. coli* como se ha descrito anteriormente).

En otros ejemplos, el resto proteico terapéutico tiene sustituciones conservativas en comparación con la secuencia de tipo silvestre. Por "sustituciones conservativas" se entienden intercambios dentro de grupos tales como reemplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; reemplazo de los restos de hidroxilo Ser y Thr; reemplazo de los restos ácidos Asp y Glu; reemplazo de los restos de amida Asn y Gln, reemplazo de los restos básicos Lys, Arg y His; reemplazo de los restos aromáticos Phe, Tyr y Trp, y reemplazo de los aminoácidos de tamaño pequeño Ala, Ser, Thr, Met y Gly. Se proporciona orientación con respecto a cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenonormalmente silenciosas, por ejemplo, en Bowie *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", Science 247: 1306-1310 (1990). En ejemplos específicos, los polipéptidos descritos en el presente documento comprenden, o como alternativa consisten en, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína terapéutica descrita en el presente documento y/o transferrina de suero, y/o proteína transferrina modificada, en los que los fragmentos o variantes tienen adiciones, sustituciones y/o deleciones de 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 o 50-150 restos de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia. En ejemplos adicionales, las sustituciones de aminoácidos son conservativas.

Las proteínas de fusión modificadas de la presente invención pueden estar compuestas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccion, o por técnicas de modificación química que se conocen bien en este campo. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en bibliografía de investigación voluminosa.

Pueden producirse modificaciones en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminales. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diversos grados en varios sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales postraduccion o pueden prepararse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidil inositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, glucosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación (véase, por ejemplo, PROTEINS -

STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, pgs. 1-12 (1983); Seifter *et al.* (1990) Meth. Enzymol. 182: 626-646; Rattan *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62.

5 La proteína terapéutica de la presente invención es péptido de tipo glucagón 1. Otras proteínas terapéuticas descritas en el presente documento incluyen interferón  $\beta$  (IFN  $\beta$ ), péptido mimético de EPO (EMP-1), T-20 y receptor de toxina soluble, tal como sinaptotagmina I.

## 10 Interferón $\beta$

La mayoría de las citocinas, incluyendo IFN  $\beta$ , tienen semividas en circulación relativamente cortas ya que se producen *in vivo* para actuar de forma local y transitoria. Para usar IFN- $\beta$  como un producto terapéutico sistémico eficaz, son necesarias dosis relativamente grandes y administraciones frecuentes. Dichas administraciones parenterales frecuentes son inconvenientes y dolorosas. Además, están asociados efectos secundarios tóxicos con la administración de IFN- $\beta$  que son tan graves que algunos pacientes con esclerosis múltiple no pueden tolerar el tratamiento. Estos efectos secundarios están probablemente asociados con la administración de una alta dosificación.

20 Se describen en el presente documento proteínas de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina con semividas aumentadas y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión con estabilidad aumentada. Dichas proteínas de fusión pueden administrarse a pacientes a dosis menores, reduciendo de este modo los efectos secundarios tóxicos asociados con IFN- $\beta$ . Se describe en el presente documento el uso de las proteínas de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina para tratar diversas enfermedades y afecciones asociadas con IFN- $\beta$ , tales como pero sin limitación esclerosis múltiple, cáncer incluyendo tumores cerebrales y cáncer cutáneo, e infecciones virales tales como hepatitis B y C. Preferentemente, las proteínas de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina se usan para tratar sujetos que padecen esclerosis múltiple.

30 El interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) es una glucoproteína con un peso molecular aparente (PM) de 23 kilodalton. El gen que codifica IFN- $\beta$  se localiza en el cromosoma 9. Su secuencia de aminoácidos que contiene 166 restos se determinó por K. Hosoi *et al.* (J. Interferon Res., 8, pp 375-384 (1988)) y su secuencia de glucósido se indicó por Y. Kagawa *et al.* (J. Biol. Chem., 263, pp 17508-17515 (1988)).

35 El IFN- $\beta$  se secreta por fibroblastos en respuesta a una infección viral o bacteriana, o exposición a células ajenas, macromoléculas o ARN. En particular, el IFN- $\beta$  inhibe la proliferación de células infectadas y estimula el sistema inmunitario. Se considera que la actividad antiviral específica de Hu-IFN- $\beta$  homogéneo está entre  $3 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  ui/mg (unidades internacionales por miligramo de proteína total) inclusive (véase Patente de Estados Unidos N° 4.289.689 y documento EP-A-94 672).

40 El "interferón beta" (IFN- $\beta$ ) o "beta-interferón" ( $\beta$ -IFN) incluye interferones de Tipo I nativos y recombinantes que muestran las mismas características farmacéuticas o similares a los interferones de Tipo I conocidos habitualmente como IFN- $\beta$ -1a e IFN- $\beta$ -1b.

Puede usarse cualquier secuencia de IFN- $\beta$  para preparar proteínas de fusión de Tf.  
45 Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4.738.931 desvela el gen de IFN- $\beta$  humano derivado de ADN cromosómico humano. Se ha depositado un fragmento de EcoRI de 1,8 kb, que contiene el ácido nucleico que codifica el IFN- $\beta$  humano, introducido en *Escherichia coli* en la Colección Americana de Cultivos Tipo en Estados Unidos como *Escherichia coli* C14 con el número de referencia ATCC 31905. El número de referencia de GenBank para la secuencia de aminoácidos de secuencia de aminoácidos de IFN- $\beta$  humano es AAA72588. El IFN- $\beta$  también podría ser una muteína como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.588.585, en la que la cisteína (Cys) que aparece normalmente en la posición 17 de la molécula de tipo silvestre o nativa se ha reemplazado por un aminoácido neutro, tal como serina o alanina. Mark *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-5666 (1984)) mostró que cuando se cambió Cys 17 por serina, el IFN mostraba el mismo espectro de actividades biológicas que IFN- $\beta$ , tales como actividad anticelular y antiproliferativa, activación de linfocitos NK y neutralización de anticuerpos anti IFN humano. La muteína también mostró mayor estabilidad que el IFN- $\beta$  humano natural (Hu) cuando se incubó a 70 °C.  
55

Debido a su actividad, el IFN- $\beta$  se considera un principio activo no solamente en el tratamiento y profilaxis de enfermedades virales tales como herpes, gripe, etc. sino también en el tratamiento de afecciones tumorales tales como encefaloma y leucemia. Se usa IFN- $\beta$  para tratar esclerosis múltiple, tumor cerebral, cáncer de piel y hepatitis B y C. Pueden usarse proteínas de fusión de IFN- $\beta$  para tratar cualquiera de estas enfermedades.  
60

El IFN- $\beta$  humano también es eficaz en el tratamiento de reestenosis coronaria en seres humanos inhibiendo selectivamente la proliferación de células de músculo liso coronario en el sitio de lesión vascular después de un procedimiento quirúrgico sin tener al mismo tiempo ningún efecto inhibitorio en la proliferación normal de células

endoteliales coronarias después del procedimiento. La Patente de Estados Unidos 5.681.558 desvela un método para tratar la reestenosis que comprende administrar IFN- $\beta$  al paciente. En consecuencia, pueden usarse proteínas de fusión de IFN- $\beta$  para tratar la reestenosis.

5 IFN- $\beta$  tiene un efecto eritropoyético sobre el crecimiento de células progenitoras de individuos que padecen varias enfermedades con una producción muy baja de glóbulos rojos. Adicionalmente, IFN- $\beta$  aumenta la formación de estallidos así como promueve una maduración más rápida hacia normoblastos e incluso reticulocitos tardíos. La Patente de Estados Unidos 5.104.653 desvela un método para la estimulación de eritropoyesis en un paciente que  
10 comprende administrar a dicho paciente una cantidad eritropoyética eficaz de IFN- $\beta$  humano. Por lo tanto, pueden usarse proteínas de fusión de IFN- $\beta$  para estimular la eritropoyesis.

Se sabe que IFN- $\beta$ , que actúa mediante STAT1 y STAT2, regula positivamente y regula negativamente una amplia diversidad de genes, la mayoría de los cuales están implicados en la respuesta inmunitaria antiviral. Aunque la  
15 mayoría de respuestas de IFN se inducen por la presencia de ARNbc, los virus tanto de ADN como de ARN son sensibles a los efectos de IFN- $\beta$  (Biron, *Seminars in Immunology*, 10: 383-390 (1998)).

IFN- $\beta$  se produce en general en respuesta a una infección viral. El interferón IFN- $\beta$  ejerce sus efectos biológicos uniéndose con receptores específicos en la superficie de células humanas. Esta unión inicia una cascada compleja  
20 de acontecimientos intracelulares que conduce a la expresión de numerosos productos génicos inducidos por interferón y marcadores, por ejemplo, 2', 5'-oligoadenilato sintetasa, b<sub>2</sub>-microglobulina y neopterinina.

(2'-5')-oligoadenilato sintetasa y proteína quinasa dependiente de ARNbc son las dos proteínas inducidas por IFN- $\beta$  mejor conocidas (Biron, 1998, mencionado anteriormente). La (2'-5')-oligoadenilato sintetasa polimeriza ATP de una  
25 manera 2'-5' única (Janeway *et al.*, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4<sup>a</sup> Edición, Nueva York, Elsevier Science/Garland Publishing pp 385-386(1999)); los oligómeros resultantes activan RNasa L, que escinde ARNm (Biron, 1998, mencionado anteriormente). La proteína quinasa dependiente de ARNbc fosforila e inactiva eIF2, un iniciador de la transcripción. Tanto (2'-5')-oligoadenilato sintetasa como proteína quinasa dependiente de ARNbc actúan solamente en presencia de ARNbc, es decir en células infectadas de forma viral. El  
30 resultado neto de la acción de estas dos proteínas es inhibir la traducción proteica, que retardará la replicación viral (Biron, 1998, mencionado anteriormente).

La regulación positiva dependiente de IFN- $\beta$  de TAP (transportador asociado con procesamiento de antígeno), Lmp2, Lmp7 actúa para aumentar la presentación de péptidos virales por moléculas del MHC de clase I para facilitar  
35 el reconocimiento de linfocitos T CD8 y la destrucción de células infectadas. TAP es la molécula responsable de cargar fragmentos peptídicos en moléculas del MHC de clase I en el RE; las proteínas Lmp son componentes del proteasoma que escinden proteínas específicamente para presentación en MHC de clase I (Janeway *et al.*, 1999, mencionado anteriormente).

40 Se sabe que IFN- $\beta$  tanto activa como induce alguna proliferación en linfocitos citolíticos naturales (NK) (Janeway *et al.*, 1999, mencionado anteriormente). Sin embargo, los interferones en sí mismos no son mitógenos. La proliferación de linfocitos NK está causada probablemente por una citocina intermediaria que está inducida por IFN- $\beta$  (Biron, 1998, mencionado anteriormente). Los linfocitos NK pueden destruir células que muestran patrones atípicos de expresión del MHC de clase I; dichas células se infectan en general de forma viral (Janeway *et al.*, 1999,  
45 mencionado anteriormente).

Aunque al final de una infección derrotada con éxito, los linfocitos T mueren por apoptosis a medida que el sistema inmunitario vuelve a un equilibrio homeostático, algunos linfocitos T deben evitar la apoptosis y entran en un estado de memoria G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> para conservar la memoria inmunológica. Estos linfocitos T de memoria se rescatan de la  
50 apoptosis interaccionando con células del estroma, que secretan IFN- $\beta$  y algunos IFN- $\alpha$  (Pilling *et al.*, *European Journal of Immunology* 29: 1041-1050 (1999)). La apoptosis de linfocitos T puede inducirse por privación de citocinas o ligamiento de Fas en la superficie celular, pero IFN- $\beta$  es capaz de bloquear ambas rutas apoptóticas. La primera ruta apoptótica está bloqueada por la regulación positiva dependiente de IFN- $\beta$  de Bcl-x, un inhibidor apoptótico. La apoptosis inducida por ligamiento con Fas se produce demasiado rápidamente para bloquearla por regulación  
55 positiva de un gen, de modo que IFN- $\beta$  debe bloquear esa ruta apoptótica por un medio diferente (Scheel-Toellner *et al.*, *European Journal of Immunology* 29: 2603-2612 (1999)). La existencia de un segundo mecanismo de bloqueo está apoyada por los resultados de Marrack *et al.* (*Journal of Experimental Medicine* 189: 521-529(1999)), que descubrieron que el IFN- $\beta$  evitaba la apoptosis de linfocitos T sin producción aumentada de Bcl-x.

60 Der *et al.* (*Proc. Nat. Acad. Sci.*, USA 95: 15623-15628 (1998)) descubrió que el IFN- $\beta$  aumentaba la transcripción de bastantes más de 100 proteínas en células de fibrosarcoma humano. Las proteínas inducidas variaban en su función de citocromos y proteínas de armazón celular hasta proteínas inmunológicamente activas tales como componentes del complemento y ARNbc adenosina desaminasa. Estos resultados indican que IFN- $\beta$  tiene efectos verdaderamente pleiotrópicos, muchos de los cuales no se entienden completamente.

Mucha investigación clínica sobre IFN- $\beta$  se centra en la actualidad en su uso como un tratamiento para esclerosis múltiple (EM). La EM es una enfermedad autoinmunitaria en la que los linfocitos T montan una respuesta inmunitaria contra antígenos de mielina propios en las células gliales del sistema nervioso central (Goodkin, 1999. Multiple sclerosis: Treatment options for patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. <[http://www.msnews.org/goodkin1\\_99.htm](http://www.msnews.org/goodkin1_99.htm)>). En 1993, la FDA aprobó inyecciones subcutáneas de IFN- $\beta$ 1b para tratamiento de EM (Revelle M., 1993, FDA licenses interferon beta-1b. (<<http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00424.html>>). El IFN- $\beta$  1b es una forma no glucosilada de IFN- $\beta$  producida en *E. coli* (Arduini *et al.*, Protein Science 8: 1867-1877 (1999)). Las experiencias adversas asociadas con terapia de IFN- $\beta$  1b incluyen: reacciones en el sitio de inyección (inflamación, dolor, hipersensibilidad y necrosis) y complejo de síntomas de tipo gripal (fiebre, escalofríos, ansiedad y confusión). Estos efectos secundarios adversos pueden de hecho, reducirse o aliviarse fusionando IFN- $\beta$  1b con transferrina como se ha descrito anteriormente.

En la actualidad, también está disponibles IFN- $\beta$  1a (una forma eucariota, glucosilada) (Goodkin, 1999, mencionado anteriormente). IFN- $\beta$  1a se produce por tecnología de ADN recombinante. El interferón beta-1a es una glucoproteína de 166 aminoácidos con un peso molecular predicho de aproximadamente 22.500 dalton. Se produce por células de mamífero (células de Ovario de Hámster Chino) en las que se ha introducido el gen de IFN- $\beta$  humano. La secuencia de aminoácidos de IFN- $\beta$  1a es idéntica a la de IFN- $\beta$  humano natural y puede usarse para realizar proteínas de fusión de Tf.

El tratamiento de proteínas de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina también pueden aliviar ataques autoinmunitarios restaurando la función de linfocitos T supresores; el cotratamiento con ácido transretinoico parece aumentar esta acción restauradora por razones desconocidas (Qu *et al.*, 1998. All-trans retinoic acid potentiates the ability of interferon beta-1b. <<http://members.tripod.com/-ThJuland/ra-beta1b.html>>). IFN- $\beta$  también puede inhibir la inducción de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (INOS) mediante IL-1 e IFN- $\gamma$ . La producción de óxido nítrico por INOS en astrocitos se ha implicado como un factor en la partenogénesis de EM (Hua *et al.* 1998. Beta inteferon prevents nitric oxide/peroxynitrate from damaging the central nervous system. (<<http://members.tripod.com/-ThJuland/nitric-oxide beta.html>>).

Se describe en el presente documento el uso de análogos de IFN- $\beta$  que son terapéuticamente eficaces para tratar diversas enfermedades asociadas con IFN- $\beta$  para generar proteínas de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina.

También se describe en el presente documento el uso de la proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina en los métodos descritos anteriormente para inhibir o estimular diversos procesos celulares y para tratamiento y prevención de las diversas enfermedades y afecciones descritas anteriormente. En particular, la proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina puede usarse para tratar esclerosis múltiple, herpes, gripe, tumor cerebral y cáncer cutáneo.

La proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina puede formularse en composiciones farmacéuticas por métodos bien conocidos. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin que describe formulaciones adecuadas. La composición farmacéutica de la proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina puede formularse en diversas formas, incluyendo líquido, gel, liofilizada o cualquier otra forma adecuada. La forma preferida dependerá de la indicación particular que se trate y resultará evidente para un experto en la materia.

La proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina puede administrarse en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada. La administración puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los modos aceptados. Por lo tanto, la administración puede ser, por ejemplo, por vía oral, por vía nasal, por vía parenteral, por vía tópica, por vía transdérmica o por vía rectal, en forma de polvo sólido, semisólido, liofilizado, o formas de dosificación líquidas, tales como por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de gelatina elásticas duras y blandas, polvos, soluciones, suspensiones o aerosoles, o similares, preferentemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para administración sencilla de dosificaciones precisas. Las composiciones incluirán un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y la proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina como el agente activo y, además, puede incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, etc.

En general, dependiendo del modo pretendido de administración, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso de la proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina, y del 99 % al 1 % en peso de un excipiente farmacéutico adecuado. La composición podría ser de aproximadamente 5 % a 75 % en peso de la proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

La vía de administración puede ser parenteral, usando un régimen de dosificación diario conveniente que puede ajustarse de acuerdo con el grado de gravedad de la enfermedad, preferentemente esclerosis múltiple, para tratar. Para dicha administración parenteral, una composición farmacéuticamente aceptable que contenga la proteína de fusión de IFN- $\beta$ /transferrina puede formarse por los métodos desvelados en las Patentes de Estados Unidos N<sup>o</sup> 4.462.940, 4.588.585 y 4.992.271.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de proteína de fusión de IFN-β/transferrina pueden administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica o por vía subcutánea o de cualquier otra manera aceptable. El modo de administración preferido dependerá de la indicación particular que se trate y resultará evidente para un experto en la materia.

5 La Patente de Estados Unidos 6.333.032 describe métodos eficaces para usar IFN-β para tratar enfermedades en vertebrados de sangre caliente, tales como esclerosis múltiple. El tratamiento de la esclerosis múltiple comprende administrar IFN-β a una dosificación de 0,022 a aproximadamente 11,11 UI/kg por día en una forma de dosificación adaptada para promover el contacto de dicha dosificación de interferón con la mucosa oral y faríngea de dicho animal. La dosificación de interferón podría ser de 0,22 a aproximadamente 8.89 UI/kg por día, o de 1,11 a aproximadamente 3,33 UI/kg de peso corporal por día.

10 Se contempla la administración del IFN-β en una forma de dosificación adaptada para asegurar el máximo contacto del interferón en dicha forma de dosificación con la mucosa oral y faríngea del ser humano o animal que se somete a tratamiento. El contacto del interferón con la mucosa puede potenciarse maximizando el tiempo de residencia de la solución de tratamiento en la cavidad oral o faríngea. Por lo tanto, los mejores resultados parecen conseguirse en pacientes humanos cuando se pide al paciente mantener dicha solución de interferón en la boca durante un periodo de tiempo. El contacto del interferón con la mucosa oral y faríngea y a continuación con el sistema linfático del ser humano o animal tratado es indudablemente el método más eficaz para administrar cantidades inmunoterapéuticas de interferón.

15 Además, se contempla el uso de la proteína de IFN-β/transferrina para la fabricación de un medicamento que es útil para el tratamiento de enfermedades asociadas con IFN-β. Las enfermedades contempladas incluyen pero sin limitación las descritas anteriormente.

#### 25 **Péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1)**

El Péptido de Tipo Glucagón 1 (GLP-1) es una hormona gastrointestinal que regula la secreción de insulina que pertenece al llamado eje enteroinsular. El eje enteroinsular designa un grupo de hormonas, liberadas de la mucosa gastrointestinal en respuesta a la presencia y absorción de nutrientes en el intestino, que promueven una liberación temprana y potenciada de insulina. El efecto de la incretina que es el efecto potenciador en la secreción de insulina es probablemente esencial para una tolerancia a la glucosa normal. GLP-1 es una hormona insulínica fisiológicamente importante porque es responsable del efecto de la incretina.

30 GLP-1 es un producto de proglucagón (Bell, *et al.*, Nature, 1983, 304: 368-371). Se sintetiza en células endocrinas intestinales en dos formas moleculares mayores principales, como GLP-1(7-36)amida y GLP-1(7-37). El péptido se identificó en primer lugar después de la clonación de ADNc y genes para proglucagón a principios de los años 80.

40 Los estudios iniciales realizados en el péptido de longitud completa GLP-1(1-37) y GLP-1(1-36<sup>amida</sup>) concluyeron que las moléculas de GLP-1 mayores están desprovistas de actividad biológica. En 1987, tres grupos de investigación independientes demostraron que la eliminación de los primeros seis aminoácidos dará como resultado una molécula de GLP-1 con actividad biológica potenciada.

45 La secuencia de aminoácidos de GLP-1 se desvela en Schmidt *et al.* (1985 Diabetologia 28 704-707). El GLP-1 humano es un péptido de 37 restos de aminoácidos que se origina a partir de proglucagón que se sintetiza en las células L en el íleon distal, en el páncreas y en el cerebro. El procesamiento del proglucagón a GLP-1 (7-36<sup>amida</sup>), GLP-1(7-37) y GLP-2 se produce principalmente en las células L. La secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-36<sup>amida</sup>) y GLP-1(7-37) es (SEC ID N°: 6):

50 **His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-X**

en la que X es NH<sub>2</sub> para GLP-1(7-36<sup>amida</sup>) y X es Gly para GLP-1(7-37).

55 Las moléculas de tipo GLP-1 poseen actividad antidiabética en sujetos humanos que padecen diabetes de Tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM)) y, en algunos casos, incluso de Tipo I. El tratamiento con GLP-1 induce actividad, tal como secreción y biosíntesis de insulina aumentada, secreción de glucagón reducida, vaciado gástrico retardado, solamente a niveles de glucosa elevados, y por lo tanto proporciona una terapia potencialmente mucho más segura que la insulina o las sulfonilureas. Los niveles postpandriales y de glucosa en pacientes pueden moverse hacia niveles normales con terapia de GLP-1 apropiada. También hay informes que sugieren que las moléculas de tipo GLP-1 poseen la capacidad para conservar e incluso restaurar la función de células beta pancreáticas en pacientes de Tipo II.

Cualquier secuencia de GLP-1 puede usarse para preparar proteínas de fusión de Tf de la presente invención, incluyendo GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) y GLP-1(7-37). GLP-1 también tiene acciones potentes en el tracto gastrointestinal. Infundido en cantidades fisiológicas, el GLP-1 inhibe fuertemente la secreción de ácido gástrico inducida por pentagastrina así como inducida por alimentos (Schjoldager *et al.*, Dig. Dis. Sci. 1989, 35: 703-708; Wettergren *et al.*, Dig Dis Sci 1993; 38: 665-673). También inhibe la tasa de vaciado gástrico y la secreción de enzima pancreática (Wettergren *et al.*, Dig Dis Sci 1993; 38: 665-673). Pueden inducirse efectos inhibidores similares en secreción y movilidad gástrica pancreática en seres humanos tras la perfusión del íleon con soluciones que contienen carbohidratos o lípidos (Layer *et al.*, Dig Dis Sci 1995, 40: 1074-1082; Layer *et al.*, Digestion 1993, 54: 385-38). Conjuntamente, la secreción de GLP-1 se estimula en gran medida, y se ha especulado que GLP-1 puede ser al menos parcialmente responsable de este efecto llamado "freno ileal" (Layer *et al.*, Digestion 1993; 54: 385-38). De hecho, estudios recientes sugieren que, fisiológicamente, los efectos de freno ileal de GLP-1 pueden ser más importantes que sus efectos en los islotes pancreáticos. Por lo tanto, en estudios de respuesta a dosis GLP-1 influye en la velocidad de vaciado gástrico a tasas de infusión al menos tan bajas como las requeridas para influir en la secreción de islotes (Nauck *et al.*, Gut 1995; 37 (supl. 2): A124).

GLP-1 parece tener un efecto en el consumo de alimentos. La administración intraventricular de GLP-1 inhibe profundamente el consumo de alimentos en ratas (Schick *et al.* en Ditschuneit *et al.* (eds.), Obesity in Europe, John Libbey & Company Ltd, 1994; pp. 363-367; Turton *et al.*, Nature 1996, 379: 69-72). Este efecto parece ser altamente específico. Por lo tanto, la amida de GLP-1 (PG 72-107) extendida en sentido N terminal está inactiva y dosis apropiadas del antagonista de GLP-1, extendida 9-39, anulan los efectos de GLP-1 (Tang-Christensen *et al.*, Am. J. Physiol., 1996, 271(4 Pt 2):R848-56). La administración periférica, aguda de GLP-1 no inhibe el consumo de alimentos de forma aguda en ratas (Tang-Christensen *et al.*, Am. J. Physiol., 1996, 271(4 Pt 2):R848-56; Turton *et al.*, Nature 1996, 379: 69-72). Sin embargo, sigue siendo posible que GLP-1 secretada de las células L intestinales también puede actuar como una señal de saciedad.

En pacientes diabéticos, se conservan los efectos insulínotropicos de GLP y los efectos de GLP-1 en el tracto gastrointestinal (Willms *et al.*, Diabetologia 1994; 37, supl.1: A118), lo que puede ayudar a restringir las excursiones de glucosa inducidas por comida, pero, lo que es más importante, también puede influir en el consumo de alimentos. Administrada por vía intravenosa, continuamente durante una semana, se ha demostrado que la GLP-1 a 4 ng/kg/min aumenta drásticamente el control glucémico en pacientes con NIDDM sin efectos secundarios significativos (Larsen *et al.*, Diabetes 1996; 45, supl. 2: 233A.).

Las proteínas de fusión de GLP-1/transferrina que comprenden al menos un análogo de GLP-1 y fragmentos de las mismas son útiles en el tratamiento de diabetes de Tipo 1 y Tipo 2 y obesidad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de GLP-1" significa GLP-1, un análogo de GLP-1 o derivado de GLP-1.

Como se usa en el presente documento, la expresión "análogo de GLP-1" se define como una molécula que tiene una o más sustituciones, deleciones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con GLP-1. Se conocen en la técnica muchos análogos de GLP-1 e incluyen, por ejemplo, GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37), Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-37), Ser<sup>8</sup>-GLP-1(7-37), Gln<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), D-Gln<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), Thr<sup>16</sup>-Lys<sup>18</sup>-GLP-1(7-37) y Lys<sup>18</sup>-GLP-1(7-37). Otros análogos incluyen versiones resistentes a peptidil peptidasa de GLP-1, en las que el extremo N terminal del péptido está protegido. Dichos análogos incluyen, pero sin limitación, GLP-1 con aminoácidos adicionales, tales como restos de histidina añadidos al extremo N terminal o sustituidos en los aminoácidos N terminales (aminoácido 7 u 8 en GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37)). En estos análogos, el extremo N terminal puede comprender los restos His-His-Ala, Gly-His-Ala, His-Gly-Glu, His-Ser-Glu, His-Ala-Glu, His-Gly-Glu, His-Ser-Glu, His-His-Ala-Glu, His-His-Gly-Glu, His-His-Ser-Glu, Gly-His-Ala-Glu, Gly-His-Gly-Glu, Gly-His-Ser-Glu, His-X-Ala-Glu, His-X-Gly-Glu, His-X-Ser-Glu, en los que X es cualquier aminoácido. La Patente de Estados Unidos 5.118.666 desvela ejemplos de análogos de GLP-1 tales como GLP-1(7-34) y GLP-1(7-35).

La expresión "derivado de GLP-1" se define como una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1 o un análogo de GLP-1, pero que tiene adicionalmente una modificación química de uno o más de sus grupos secundarios de aminoácidos, átomos de carbono  $\alpha$ , grupos amino terminales o grupos de ácidos carboxílicos terminales. Una modificación química incluye, pero sin limitación, añadir restos químicos, crear nuevos enlaces y retirar restos químicos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto relacionado con GLP-1" se refiere a cualquier compuesto que quede dentro de la definición de GLP-1, análogo de GLP-1 o derivado de GLP-1.

El documento WO 91/11457 desvela análogos de los péptidos de GLP-1 activos 7-34, 7-35, 7-36 y 7-37 que también pueden ser útiles como restos de GLP-1.

El documento EP 0708179-A2 (Eli Lilly & Co.) desvela análogos y derivados de GLP-1 que incluyen un grupo imidazol N terminal y opcionalmente un grupo acilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> no ramificado unido al resto de lisina en la posición 34.

El documento EP 0699686-A2 (Eli Lilly & Co.) desvela ciertos fragmentos truncados N terminales de GLP-1 que se ha indicado que son biológicamente activos.

5 La Patente de Estados Unidos 5.545.618 desvela moléculas de GLP-1 que consisten esencialmente en GLP-1(7-34),  
 10 GLP1(7-35), GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37), o las formas amida de las mismas, y sales farmacéuticamente aceptables  
 de las mismas, que tienen al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en: (a) sustitución de  
 lisina por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina,  
 15 metionina, fenilalanina, arginina, o D-lisina en la posición 26 y/o posición 34; o sustitución de arginina por glicina,  
 serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina,  
 20 lisina, o D-arginina en la posición 36; (b) sustitución de triptófano por un aminoácido resistente a la oxidación en la  
 posición 31; (c) sustitución de al menos uno de: valina por tirosina en la posición 16; serina por lisina en la posición  
 18; ácido glutámico por ácido aspártico en la posición 21; glicina por serina en la posición 22; glutamina por arginina  
 en la posición 23; alanina por arginina en la posición 24; y lisina por glutamina en la posición 26; y (d) sustitución de  
 25 alanina por al menos uno de: glicina, serina o cisteína en la posición 8; ácido glutámico por ácido aspártico, glicina,  
 serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina  
 en la posición 9; glicina por serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina,  
 leucina, metionina, o fenilalanina en la posición 10; y ácido aspártico por ácido glutámico en la posición 15; y (e)  
 30 sustitución de histidina por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina,  
 isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina, o la forma D o N-acilada o alquilada de histidina en la posición 7; en la  
 que, en las sustituciones, es (a), (b), (d) y (e), los aminoácidos sustituidos pueden opcionalmente estar en la forma D  
 y los aminoácidos sustituidos en la posición 7 pueden estar opcionalmente en la forma N-acilada o N-alquilada.

La Patente de Estados Unidos N° 5.118.666 desvela una molécula de GLP-1 que tiene actividad insulínica.  
 25 Dicha molécula se selecciona del grupo que consiste en un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos His-Ala-  
 Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys (SEC  
 ID N°: 7) o His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-  
 Leu-Val-Lys-Gly (SEC ID N°: 8); y un derivado de dicho péptido y en el que dicho péptido se selecciona del grupo  
 que consiste en: una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable de dicho péptido; una sal carboxilato  
 30 farmacéuticamente aceptable de dicho péptido, un alquiléster inferior farmacéuticamente aceptable de dicho péptido;  
 y una amida farmacéuticamente aceptable de dicho péptido seleccionada del grupo que consiste en amida, alquil  
 amida inferior y dialquil amida inferior.

La Patente de Estados Unidos 6.277.819 enseña un método para reducir la mortalidad y morbilidad después de  
 35 infarto de miocardio que comprende administrar GLP-1, análogos de GLP-1 y derivados de GLP-1 al paciente. El  
 análogo de GLP-1 se representa por la siguiente fórmula estructural (SEC ID N°: 9):  $R_1-X_1-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-X_2-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-X_3-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R_2$   
 y sales  
 farmacéuticamente aceptables de la misma, en la que:  $R_1$  se selecciona del grupo que consiste en L-histidina, D-  
 histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxihistidina, homohistidina, alfa-fluorometil-histidina y alfa-  
 40 metil-histidina;  $X_1$  se selecciona del grupo que consiste en Ala, Gly, Val, Thr, Ile y alfa-metil-Ala;  $X_2$  se selecciona del  
 grupo que consiste en Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly;  $X_3$  se selecciona del grupo que consiste en Glu, Gln, Ala, Thr,  
 Ser y Gly;  $R_2$  se selecciona del grupo que consiste en  $NH_2$ , y Gly-OH; siempre que el análogo de GLP-1 tenga un  
 punto isoeléctrico en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0 y además siempre que  $R_1$  sea  
 His,  $X_1$  sea Ala,  $X_2$  sea Glu y  $X_3$  sea Glu,  $R_2$  debe ser  $NH_2$ .

45 Ritzel *et al.* (Journal of Endocrinology, 1998, 159: 93-102) desvelan un análogo de GLP-1,  $[Ser^8]GLP-1$ , en el que el  
 segundo aminoácido N terminal, alanina, se reemplaza con serina. La modificación no alteró la acción insulínica  
 del péptido pero produjo un análogo con estabilidad en plasma aumentada en comparación con GLP-1.

La Patente de Estados Unidos 6.429.197 enseña que el tratamiento con GLP-1 después de ictus agudo o  
 50 hemorragia, preferentemente administración intravenosa, puede ser un tratamiento ideal porque proporciona un  
 medio para optimizar la secreción de insulina, aumentar el anabolismo cerebral, potenciar la eficacia de la insulina  
 suprimiendo el glucagón y mantener la euglucemia o hipoglucemia leve sin riesgo de hipoglucemia grave u otros  
 efectos secundarios adversos. La presente invención proporciona un método para tratar el cerebro isquémico o  
 55 reperfundido con GLP-1 o sus análogos biológicamente activos después de ictus agudo o hemorragia para optimizar  
 la secreción de insulina, para potenciar la eficacia de insulina suprimiendo el antagonismo de glucagón, y para  
 mantener la euglucemia o hipoglucemia leve sin riesgo de hipoglucemia grave.

La Patente de Estados Unidos 6.277.819 proporciona un método para reducir la mortalidad y morbilidad después de  
 60 infarto de miocardio, que comprende administrar a un paciente que lo necesite un compuesto seleccionado del grupo  
 que consiste en GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de GLP-1 y sales farmacéuticamente aceptables de los  
 mismos, a una dosis eficaz para normalizar la glucosa en sangre.

La Patente de Estados Unidos 6.191.102 desvela un método para reducir el peso corporal en un sujeto que necesite  
 65 reducción de peso corporal administrando al sujeto una composición que comprende un péptido de tipo glucagón 1  
 (GLP-1), un análogo de péptido de tipo glucagón (análogo de GLP-1), un derivado de péptido de tipo glucagón  
 (derivado de GLP-1) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos en una dosis suficiente para provocar la

reducción del peso corporal durante un periodo de tiempo eficaz para producir pérdida de peso, siendo dicho tiempo al menos 4 semanas.

5 GLP-1 está completamente activo después de administración subcutánea (Ritzel *et al.*, Diabetologia 1995; 38: 720-725), pero se degrada rápidamente principalmente debido a la degradación por enzimas de tipo dipeptidil peptidasa IV (Deacon *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 1995, 80: 952-957; Deacon *et al.*, 1995, Diabetes 44: 1126-1131). Por lo tanto, desafortunadamente, GLP-1 y muchos de sus análogos tienen una semivida en plasma corta en seres humanos (Orskov *et al.*, Diabetes 1993; 42: 658-661). En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar proteínas de fusión de transferrina que comprenden GLP-1 o análogos del mismo que tienen un perfil de acción prolongado en relación con GLP-1(7-37). Es un objeto adicional de la divulgación proporcionar derivados de GLP-1 y análogos de los mismos que tienen una eliminación menor que GLP-1(7-37). Además, es un objeto de la invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión de GLP-1/transferrina o proteínas de fusión de análogo de GLP-1/transferrina con estabilidad mejorada. Adicionalmente, la presente invención incluye proteínas de fusión de GLP-1/transferrina o proteínas de fusión de análogos de GLP-1/transferrina para su uso para tratar enfermedades asociadas con GLP-1 tales como pero sin limitación las descritas anteriormente.

20 En un aspecto de la presente invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión del péptido de GLP-1/transferrina y proteínas de fusión de análogo de GLP-1/transferrina pueden formularse por cualquiera de los métodos establecidos para formular composiciones farmacéuticas, por ejemplo como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985. La composición puede estar en una forma adecuada para inyección o infusión sistémica y puede, como tal, formularse con un vehículo líquido adecuado, tal como agua estéril o una solución salina isotónica o solución de glucosa. Las composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales que se conocen bien en este campo. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con la solución acuosa estéril antes de su administración. La composición puede contener sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes, agentes de ajuste de tonicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, etc.

30 Las proteínas de fusión de GLP-1/transferrina y proteínas de fusión de análogo de GLP-1/transferrina de la presente invención también pueden adaptarse para administración nasal, transdérmica, pulmonar o rectal. El vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable empleado en la composición puede ser cualquier vehículo sólido convencional. Son ejemplos de vehículos sólidos lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio y ácido esteárico. De forma similar, el vehículo o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como gliceril monoestearato o gliceril diestearato, solo o mezclado con una cera.

40 Puede ser particularmente ventajoso proporcionar la composición de la invención en forma de una formulación de liberación sostenida. Como tal, la composición puede formularse como microcápsulas o micropartículas que contienen la proteína de fusión de GLP-1/transferrina o proteína de fusión de análogo de GLP-1/transferrina encapsulada por o dispersada en un polímero biodegradable farmacéuticamente aceptable adecuado tal como ácido poliláctico, ácido poliglicólico o un copolímero de ácido láctico/ácido glicólico.

45 Par administración nasal, la preparación puede contener proteínas de fusión de GLP-1/transferrina o proteínas de fusión de análogo de GLP-1/transferrina disueltas o suspendidas en un vehículo líquido, en particular un vehículo acuoso, para aplicación de aerosol. El vehículo puede contener aditivos tales como agentes solubilizantes, por ejemplo propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabenos.

50 En general, los compuestos de la presente invención se distribuyen en forma de dosificación unitaria que comprende 0,5-500 mg de la proteína de fusión junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable por dosificación unitaria.

55 Además, la presente invención contempla el uso de las proteínas de fusión de GLP-1/transferrina y análogo de GLP-1/transferrina para la fabricación de un producto medicinal que puede usarse en el tratamiento de enfermedades asociadas con nivel de glucosa elevado, tales como pero sin limitación las descritas anteriormente. Específicamente, la presente invención contempla la proteína de fusión de GLP-1/transferrina para su uso en el tratamiento de diabetes incluyendo diabetes de tipo II, obesidad, quemaduras graves e insuficiencia cardíaca, incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva y síndrome coronario agudo.

60 El extremo N de GLP-1 está normalmente amidado. En levadura, no se produce amidación. En una realización de la invención, para compensar la amidación en el extremo N terminal que no se produce en levadura, se añade un aminoácido extra en el extremo N terminal de GLP-1. La adición de un aminoácido al extremo N terminal de GLP-1 puede evitar que la dipeptidil peptidasa escinda en el segundo aminoácido de GLP-1 debido a impedimento estérico. Por lo tanto, el GLP-1 permanecerá funcionalmente activo. Puede añadirse cualquiera de los 20 aminoácidos al extremo N terminal de GLP-1. En algunos casos, puede usarse un aminoácido sin carga o con carga positiva y,

preferentemente, se añade un aminoácido más pequeño tal como glicina. El GLP-1 con el aminoácido extra se fusiona después con transferrina. En consecuencia, el GLP-1 con el aminoácido añadido se fusionará en el extremo N terminal de la proteína de fusión de GLP-1/transferrina.

- 5 En una realización de la preparación del péptido de GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37) más resistente a escisión por dipeptidil peptidasa, se añade un resto de His en el extremo N terminal de GLP-1 o se inserta después del resto de His en el extremo N terminal de GLP-1, de modo que el extremo N terminal de GLP-1 comienza con His-His.

- 10 En otra realización de la invención, el segundo resto desde el extremo N terminal en el péptido GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37) (SEC ID N<sup>o</sup>: 6) se sustituye con otro aminoácido. Por ejemplo, el resto de Ala en el segundo resto desde el extremo N terminal en el péptido GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37) puede sustituirse con Ser, Gly, Val u otro aminoácido.

**Proteína de fusión de GLP-mTf para tratar diabetes de tipo 2**

- 15 Como se ha analizado anteriormente, el GLP-1 activa y regula sistemas hormonales endocrinos importantes en el cuerpo y desempeña un papel de control crítico en el metabolismo de la glucosa. A diferencia de los otros tratamientos diabéticos en el mercado GLP-1 tiene el potencial de ser restaurador actuando como un factor de crecimiento para linfocitos B mejorando de este modo la capacidad del páncreas para secretar insulina y también, para hacer que los niveles de insulina existentes actúen más eficazmente mejorando la sensibilidad y estabilizando mejor los niveles de glucosa. Esto reduce la carga en el control diario de los niveles de glucosa y potencialmente ofrece un retardo en los efectos secundarios a largo plazo graves provocados por fluctuaciones en la glucosa en sangre debido a diabetes. Además, GLP-1 puede reducir el apetito y reducir el peso. La obesidad es una consecuencia inherente del mal control del metabolismo de la glucosa y esto solo sirve para agravar la condición diabética.

- 25 La aplicación clínica de GLP-1 natural está limitada debido a que se degrada rápidamente en la circulación (la semivida es de varios minutos). Mantener los niveles terapéuticos en circulación requiere administración constante de altas dosis usando bombas o dispositivos de parche que aumentan el coste de tratamiento. Esto es inconveniente para uso crónico a largo plazo especialmente junto con todos los otros medicamentos para tratar diabetes y controlar los niveles de glucosa. Las proteínas de fusión de GLP-1 conservan la actividad de GLP-1 pero tienen las propiedades de larga semivida (14-17 días), solubilidad y biodistribución de transferrina (mTf). Estas propiedades podrían proporcionar una inyección s.c. (subcutánea) de bajo coste, pequeño volumen, mensual y este tipo de producto es absolutamente necesario para uso crónico a largo plazo.

35 **Insulina**

- La insulina humana contiene dos cadenas peptídicas, conocidas como las cadenas A y B, que son de 21 y 30 aminoácidos de longitud, respectivamente, y que se conectan por dos enlaces disulfuro de cistina. Este péptido tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa. El precursor inmediato de la insulina es proinsulina, un péptido monocatenario compuesto de las cadenas B y A unidas con un péptido conector de aproximadamente 31 aminoácidos, conocido como el péptido C, por pares adyacentes de restos básicos. La disposición de estos tres péptidos en la molécula de proinsulina, comenzando con el extremo amino terminal, es la siguiente: cadena B-Arg-Arg-C-péptido-Lys-Arg-cadena A. Sin embargo, cuando se traduce a ARNm, se produce preproinsulina, que contiene proinsulina unida en su extremo amino terminal con un péptido señal en gran medida hidrófobo de 24 aminoácidos de longitud.

- 50 La preproinsulina se sintetiza en células beta pancreáticas, localizadas dentro de los islotes de Langerhans, que están dispersos por todo el páncreas. Se produce la eliminación del péptido señal en el retículo endoplásmico rugoso, y la proinsulina resultante se transporta después al aparato de Golgi para empaquetar en gránulos de secreción. La proinsulina plegada se estabiliza por enlaces disulfuro. Durante el procesamiento de los gránulos de secreción, la molécula de proinsulina plegada se escinde por proteasas específicas en los restos básicos emparejados para liberar insulina y el péptido C.

- 55 La diabetes mellitus es una enfermedad que afecta a aproximadamente 17 millones de personas en los Estados Unidos, o el 6,2 % de la población. Anualmente se diagnostica diabetes a aproximadamente un millón de personas por encima de 20 años de edad, y la diabetes es la sexta causa principal de muerte en los Estados Unidos (<http://www.niddk.nih.gov/health/diabetes/pubs/dmstats/dmstats.htm#7>). Aproximadamente el 90-95 % de los casos de diabetes son de Tipo 2, anteriormente denominada diabetes de aparición en adultos, que comienza como resistencia a insulina (incapacidad de las células del cuerpo para usar insulina de forma apropiada) y progresa hasta una incapacidad del páncreas para producir insulina. La diabetes de Tipo 1, denominada anteriormente diabetes juvenil o diabetes insulino dependiente, representa el 5-10 % restante de los casos de diabetes. En diabetes de tipo 1, el sistema inmunitario del cuerpo destruye las células beta en el páncreas, que fabrican insulina.

- 65 Debido a que la insulina humana contiene solamente 51 restos de aminoácidos, se prepara fácilmente por técnicas recombinantes, y se ha preparado un gran número de análogos y variantes de insulina. Puede usarse cualquiera de estos análogos o variantes para preparar proteínas de fusión de mTf como se describe en el presente documento.

La diabetes requiere normalmente terapia de reemplazo de insulina, que implica una o más dosis del fármaco por día de inyección subcutánea. El tratamiento por inyección, sin embargo, es tanto fisiológica como físicamente doloroso, además de requerir conocimientos técnicos, y muchos diabéticos requieren asistencia en la administración de inyecciones. Las formulaciones orales de insulina no han sido exitosas, sin embargo, porque el péptido se degrada rápidamente en el ambiente ácido del tracto GI, particularmente en el estómago. No obstante, se han intentado alternativas a la inyección, tales como formulaciones orales, nasales y tópicas. La Patente de Estados Unidos 5.824.638, Burnside *et al.*, describe preparaciones de emulsión oral en las que la insulina se disuelve en una fase hidrófila, tal como agua, solución salina o un alcohol miscible en agua, y se dispersa con un tensioactivo en una fase hidrófoba, tal como un ácido graso de cadena larga o éster de ácido graso. Aunque una emulsión mantiene la insulina dispersa, no puede proteger el péptido de las duras condiciones del estómago. Se desvelan preparaciones nasales, que suministran insulina en un aerosol a los pulmones, en la Patente de Estados Unidos 6.427.681, Gonda *et al.*, mientras que se desvelan preparaciones tópicas en la Patente de Estados Unidos 6.399.566, Dardai *et al.*

También se han desarrollado insulinas modificadas para inyección, que contienen sustituciones de aminoácidos o restos glucosilados, para potenciar la actividad, inhibir la degradación o inhibir la agregación de péptidos (véase Patente de Estados Unidos 4.478.746, Kim *et al.*, glycosylated insulin derivatives; Patente de Estados Unidos 4.992.418, Katsoyanis *et al.*, Asp<sub>10</sub>-containing insulin (B chain) for increased activity; Patente de Estados Unidos 5.716.927, Balschmidt *et al.*, Lys or Arg at position 28 in the B chain, or A18, A21 or B3 modified from Asn, or other modifications at the C-terminal end of the B chain, to prevent aggregation and reduced activity). Se desvelan sustituciones de aminoácidos adicionales que confieren una fase activa más larga, porque pueden acilarse, en la Patente de Estados Unidos 5.750.497, Havelund *et al.* A21 B3 y B30 pueden reemplazarse por cualquier aminoácido excepto Lys, Arg o Cys. B1 puede suprimirse, y B30 puede reemplazarse por una cadena lipófila de 10-24 átomos de carbono. Se describen proteínas de fusión para producción recombinante mejorada de insulina (mayores rendimientos, soluble, que permite plegamiento correcto) en la Patente de Estados Unidos 6.534.288, Habermann *et al.* Estos péptidos contienen una parte de fusión del extremo amino terminal de la cadena B, seguido de los aminoácidos RDVP-Y<sub>n</sub>-cadena A, en la que Y es un péptido de 2-50 aminoácidos de longitud, que termina con un aminoácido básico.

Se describen en el presente documento proteínas de fusión que comprenden transferrina y una proteína o un péptido de insulina. Las proteínas de fusión pueden formularse para suministro oral. Se contemplan métodos para administrar por vía oral proteínas de fusión de insulina a un paciente que lo necesite, en particular, un paciente diabético.

También se describen proteínas de fusión de transferrina que comprenden análogo de insulina monocatenario (Lee *et al.*, 2000, Nature, 408: 483). La insulina en la proteína de fusión de transferrina puede contener un sitio de escisión de proteasa específico para el tracto gastrointestinal (GI), o una parte específica del tracto gastrointestinal, de modo que el sitio se reconocería por una o más enzimas en el tracto GI. La proinsulina podría activarse de esta manera. El sitio de escisión podría residir en el péptido que enlaza la cadena A y B.

#### 40 **Péptido mimético de EPO (EMP)**

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glucoproteica que se sintetiza en los riñones de mamíferos para estimular la división celular mitótica y diferenciación de células precursoras de eritrocitos. En consecuencia, la EPO actúa para estimular y regular la producción de eritrocitos. Debido a su papel en la formación de glóbulos rojos, la EPO es útil tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por producción de glóbulos rojos baja o defectuosa.

Los estudios han mostrado la eficacia de la terapia con EPO en diversas patologías, trastornos y estados de irregularidad hematológica, por ejemplo, beta-talasemia (Vedovato *et al.* (1984) Acta. Haematol. 71: 211-213); fibrosis quística (Vichinsky *et al.* (1984) J. Pediatric 105: 15-21); embarazo y trastornos menstruales (Cotes *et al.* (1983) Brit. J. Obstet. Gynaecol. 90: 304-311); anemia temprana del prematuro (Haga *et al.* (1983) Acta Pediatr. Scand. 72: 827-831); lesión de la médula espinal (Claus-Walker *et al.* (1984) Arch. Phys. Med. Rehabil. 65: 370-374); vuelo espacial (Dunn *et al.* (1984) Eur. J. Appl. Physiol. 52: 178-182); pérdida de sangre aguda (Miller *et al.* (1982) Brit. J. Haematol. 52: 545-590); envejecimiento (Udupa *et al.* (1984) J. Lab. Clin. Med. 103: 574-588); diversas patologías neoplásicas acompañadas de eritropoyesis anómala (Dainiak *et al.* (1983) Cancer 5: 1101-1106); e insuficiencia renal (Eschbach *et al.* (1987) N. Eng. J. Med. 316: 73-78). Durante los últimos quince años, la EPO se ha usado para tratamiento de la anemia de insuficiencia renal, anemia de enfermedad crónica asociada con artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, SIDA y cáncer, así como para el tratamiento de la anemia en tumores malignos hematopoyéticos, postrasplante de médula ósea y donación de sangre autóloga.

La actividad de EPO está mediada por su receptor. El receptor de EPO (EPO-R) pertenece a la clase de receptores de tipo factor de crecimiento que se activan por una dimerización proteica inducida por ligando. Otras hormonas y citocinas tales como hormona del crecimiento humano (hGH), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor del crecimiento epidérmico (EGF) y la insulina pueden entrecruzar dos receptores dando como resultado la yuxtaposición de dos colas citoplasmáticas. Muchos de estos receptores activados por dimerización tienen dominios proteína quinasa dentro de las colas citoplasmáticas que fosforilan la cola vecina tras su

dimerización. Aunque algunas colas citoplasmáticas carecen de actividad quinasa intrínseca, estas actúan por asociación con proteína quinasas. El receptor de EPO es de este último tipo. En cada caso, la fosforilación da como resultado la activación de una ruta de señalización.

- 5 Ha habido un interés creciente en la imitación molecular con potencia de EPO. Por ejemplo, la dimerización del receptor de eritropoyetina (EPOR) en presencia de EPO natural o péptidos miméticos de EPO sintéticos (EMP) es el acontecimiento extracelular que conduce a la activación del receptor y acontecimientos de transducción de señal corriente abajo. En general, existe un interés en la obtención de miméticos con potencia equivalente a EPO.
- 10 Wrighton *et al.* (1996, *Science*, 273: 458-463) emplearon presentación en fagos en la que los péptidos aleatorios se exponen en proteínas de la cubierta de fago filamentoso. Se permitió que una biblioteca de fagos con péptidos aleatorios se unieran con y eluyeran posteriormente del dominio extracelular del receptor de EPO en el sistema de exploración. Usaron sistema de unión débil para extraer primero CRIGPITWVC (SEC ID N°: 10) de unión débil con el dominio de EPO (Kd 10 nM) como la secuencia consenso. Por consiguiente, se aisló un péptido de 20 aminoácidos,
- 15 EMP1, (GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG, SEC ID N°: 11) con una afinidad (Kd) de 200 nM, en comparación con 200 pM para EPO, cuya secuencia no existe realmente en la EPO nativa. La estructura cristalina a una resolución de 2,8 Å de un complejo de este péptido agonista mimético con el dominio extracelular del receptor de EPO reveló que un dímero peptídico induce una dimerización doble casi perfecta del receptor (Livnah *et al.*, 1996 *Science*, 273 (274): 464-471). Este péptido de 20 aminoácidos tiene una estructura en lámina beta y se estabiliza por el enlace disulfuro
- 20 C-C.

La actividad biológica de EMP1 indica que EMP1 puede actuar como un mimético de EPO. Por ejemplo, EMP1 compite con EPO en los ensayos de unión a receptor para provocar proliferación celular de líneas celulares modificadas técnicamente para que sean sensibles a EPO (Wrighton *et al.*, 1996, *Science*, 273: 458-463). Tanto

25 EPO como EMP1 inducen una cascada similar de acontecimientos de fosforilación y progresión del ciclo celular en células sensibles a EPO (Wrighton *et al.*, 1996, *Science*, 273: 458-463). Además, EMP1 demuestra efectos eritropoyéticos significativos en ratones como se controla por dos ensayos *in vivo* diferentes de producción de glóbulos rojos nacientes (Wrighton *et al.*, 1996, *Science*, 273: 458-463).

30 Johnson *et al.* (1998, *Biochemistry*, 37: 3699-3710) identificaron el péptido mínimo que conservaba actividad en los ensayos para acción mimética de EPO. Usando delecciones N y C terminales, descubrieron que el péptido activo mínimo es EMP20, que tiene la secuencia YSCHFGPLTWVCK (SEC ID N°: 12), concretamente los aminoácidos 4 a 16 de EMP1. También descubrieron que Tyr4 y Trp13 de EMP1 son críticos para la acción mimética.

35 Se describen en la presente memoria proteínas de fusión de EMP1/transferrina con semivida aumentada y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión. Cualquier secuencia de EMP1 puede usarse para preparar proteínas de fusión de EMP1/transferrina, incluyendo secuencias de EMP1 en las que se suprimen o reemplazan uno o más restos C. Estas secuencias pueden insertarse después en un bucle mTf para proporcionar una estructura tridimensional a la región EMP1 de la proteína de fusión. Se contempla el uso de la

40 proteína de fusión para tratar diversas enfermedades y afecciones asociadas con EPO tales como pero sin limitación las descritas anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión de EMP1/transferrina pueden formularse por cualquiera de los métodos establecidos para formular composiciones farmacéuticas, por ejemplo como se

45 describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985. La composición puede estar en una forma adecuada para la inyección o infusión sistémica y puede, como tal, formularse con un vehículo líquido adecuado tal como agua estéril o una solución salina isotónica o solución de glucosa. Estas composiciones farmacéuticas pueden contener tampones, sales y otros excipientes para estabilizar la composición o ayudar en el suministro de las proteínas de fusión de transferrina.

50 Se describe en el presente documento un método para tratar trastornos asociados con EPO. El método se consigue administrando una proteína de fusión de EMP1/transferrina proporcionada en el presente documento durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para aliviar los síntomas del trastorno, es decir suficientes para efectuar dimerización o activación biológica de receptores de EPO. En el caso de EPO dicha metodología es útil en el

55 tratamiento de diálisis/insuficiencia renal de estadio final; anemia, especialmente asociada con SIDA o enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide e inflamación crónica del intestino; enfermedad autoinmunitaria; y para reforzar el recuento de glóbulos rojos del paciente cuando sea necesario, por ejemplo antes de la cirugía o como pretratamiento para la transfusión. La proteína de fusión de EMP1/transferrina descrita en el presente documento que se comporta como agonista de EPO puede usarse para activar megacariocitos.

60 Ya que se ha mostrado que EPO tiene un efecto mitógeno y quimiotáctico en las células endoteliales vasculares así como un efecto en neuronas colinérgicas centrales (Amagnostou *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 597805982; Konishi *et al.* (1993) *Brain Res.* 609: 29-35), los compuestos descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar diversos trastornos vasculares, tal como promoviendo la curación de heridas, el

65 crecimiento de vasos sanguíneos coronarios colaterales, (tales como los que pueden aparecer después de infarto de miocardio), traumatismo y tratamiento postinjertos vasculares y diversos trastornos neurológicos, caracterizados en

general por niveles absolutos bajos de acetil colina o niveles relativos bajos de acetil colina en comparación con otras sustancias neuroactivas, por ejemplo neurotransmisores.

5 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden, como un principio activo, la proteína de fusión de EMP1/transferrina descrita en el presente documento en asociación con un vehículo o diluyente farmacéutico. La proteína de fusión de EMP1/transferrina descrita en el presente documento puede administrarse por vías oral, parenteral (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), transdérmica (bien pasiva o usando iontoforesis o electroporación) o transmucosa (nasa, vaginal, rectal o sublingual) de administración en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

10 Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Puede prepararse adicionalmente comprimidos y píldoras con recubrimientos entéricos.

15 Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes farmacéuticamente aceptables, conteniendo los elixires diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua. Además de dichos diluyentes inertes, las composiciones también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, y agentes edulcorantes, saporíferos y perfumantes.

20 Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Dichas formas de dosificación también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y de dispersión. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, incorporando agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones o calentando las composiciones. También pueden fabricarse usando agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes de su uso.

25 Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes tales como manteca de cacao o una cera de supositorio. También se preparan composiciones para administración nasal o sublingual con excipientes convencionales bien conocidos en la técnica.

30 La dosificación del principio activo de las composiciones puede ser variada; sin embargo, es necesario que la cantidad del principio activo sea tal que se obtenga una dosificación adecuada. La dosificación seleccionada depende del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración y de la duración del tratamiento deseado. Generalmente se administran a mamíferos niveles de dosificación de entre 0,001 y 10 mg/kg de peso corporal diariamente.

35 Además, se contempla el uso de la proteína de fusión de transferrina que comprende EMP1 o análogos de la misma para la fabricación de un producto medicinal que puede usarse en el tratamiento de enfermedades asociadas con producción de glóbulos rojos baja o defectuosa. Los ejemplos de dichas enfermedades no se limitan a las descritas anteriormente.

#### 50 T-20 y T-1249

La infección por VIH es pandémica y las enfermedades asociadas con VIH representan un problema de salud mundial importante. Aunque se están realizando considerables esfuerzos en el diseño exitoso de productos terapéuticos eficaces, en la actualidad no existen fármacos antirretrovirales curativos contra el SIDA. En los intentos de desarrollar dichos fármacos, se han tenido en cuenta varios estadios del ciclo de vida del VIH como dianas para la intervención terapéutica (Mitsuya, H. *et al.*, 1991, FASEB J. 5: 2369-2381). Por ejemplo, la transcriptasa inversa codificada por el virus ha sido un centro de atención del desarrollo farmacológico. Se han desarrollado varios fármacos dirigidos a transcriptasa inversa, incluyendo análogos de 2',3'-didesoxinucleósido tales como AZT, ddl, ddc y d4T que se ha mostrado que son activos contra VIH (Mitsuya, H. *et al.*, 1991, Science 249: 1533-1544). Aunque son beneficiosos, estos análogos de nucleósidos no son curativos, probablemente debido a la rápida aparición de mutantes de VIH resistentes a fármacos (Lander, B. *et al.*, 1989, Science 243: 1731-1734). Además, los fármacos muestran con frecuencia efectos secundarios tóxicos, tales como supresión de la médula ósea, vómitos y anomalías de la función hepática.

65 Los inhibidores de entrada son distintos de las clases existentes de fármacos que combaten el VIH. Otros fármacos actúan dentro de la célula infectada. Inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósidos tales como AZT y abacavir e inhibidores de transcriptasa inversa no nucleosídicos como nevirapina y efavirenz actúan todos deteniendo la

enzima transcriptasa inversa que el VIH usa para replicarse una vez que está dentro de la célula. Los inhibidores de proteasa detienen la enzima proteasa viral que el VIH usa para empaquetarse para exportación. Por el contrario, los inhibidores de entrada son fármacos que interfieren con los procesos implicados en el asalto inicial del virus a la membrana externa de la célula.

5 T-20 es el más estudiado de todos los inhibidores de entrada y es el primer miembro de la clase inhibidora de fusión. A diferencia de los fármacos del SIDA existentes que actúan dentro de la célula y se dirigen a enzimas virales implicadas en la replicación del virus, T-20 inhibe la fusión del VIH con células hospedadoras antes de que el virus entre en la célula y comience su proceso de replicación. T-20 se une a uno de los dos dominios helicoidales de gp41. Gp41 es una proteína del VIH-1 de resorte que se activa cuando CD4 se une a gp-120 del VIH. La acción de fusión de gp41 se inhibe si sus dos dominios helicoidales no pueden plegarse entre sí. T-20 se une a gp41, evitando de hecho que la proteína actúe. Se ha mostrado en estudios clínicos de una rama, tempranos, que es aproximadamente tan potente como un inhibidor de proteasa por sí solo proporcionando reducciones más de 10 veces de la carga viral, y que es seguro en combinación con otros antirretrovirales.

15 La Patente de Estados Unidos 5.464.933 desvela T-20 (pentafuside, DP-178) como un péptido sintético de 36 aminoácidos. Ya que este fármaco es un péptido, no pueden proporcionarse por vía oral porque se degrada fácilmente por el sistema digestivo. Cuando se administra por inyección subcutánea, T-20 consigue niveles suficientes en la sangre para tener actividad anti VIH. Se administra por inyección subcutánea dos veces al día. Sin embargo, los pacientes desarrollan reacciones cutáneas en el sitio de inyección. Los acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento más frecuentemente indicados fueron reacciones en sitios de inyección locales de leves a moderadas. Estas consisten en dolor leve, hinchazón y rojez temporal en el sitio de inyección.

25 La Patente de Estados Unidos 6.479.055 desvela análogos peptídicos del DP-178 (péptidos correspondientes a los restos de aminoácidos 638 a 673 de la proteína transmembrana gp41 de HTV-1<sub>LAI</sub>, que muestran capacidad anti fusión de membrana, actividad antiviral, tal como la capacidad para inhibir la transmisión del VIH a células CD-4<sup>+</sup> no infectadas, o una capacidad para modular los procesos intracelulares que implican estructuras peptídicas superenrolladas. Además, la patente se refiere al uso de DP-178 y partes de DP-178 y/o análogos como compuestos antifusogénicos o antivirales o como inhibidores de acontecimientos intracelulares que implican estructuras peptídicas superenrolladas. Además, la patente enseña el uso de los péptidos como agentes de diagnóstico. Por ejemplo, un péptido DP178 puede usarse como un diagnóstico específico de subtipo de VIH.

30 T-1249 es un compuesto hermano de T-20. Como T-20, T-1249 se dirige a la glucoproteína del VIH conocida como gp41 que el VIH usa para unirse con células CD4. T-1249 ha mostrado potentes efectos anti VIH en estudios animales y de laboratorio. Estudios preliminares de seguridad, dosificación y eficacia en seres humanos han proporcionado apoyo para investigación continuada.

35 T-1249 se administra en la actualidad por inyección subcutánea (bajo la piel) una o dos veces al día. El primer estudio de seguridad de T-1249 realizado en seres humanos halló dos acontecimientos adversos graves: reacción de hipersensibilidad (úlceras orales, erupción maculopapular, fiebre) y neutropenia grave. El cuarenta por ciento de los receptores desarrollaron reacciones en el sitio de inyección pero estas se consideraron leves. También se han indicado por los receptores mareos, diarrea, cefalea y fiebre. No se ha identificado ninguna toxicidad limitante de dosis y son probables experimentos con mayores dosis.

45 T-1249 ha completado los estudios de seguridad y dosificación de fase I/II. Los resultados iniciales han indicado que dosis mayores producen un descenso de la carga viral promedio de 1,3 log.

50 Se han indicado reducciones dependientes de dosis del ARN de VIH. En el estudio de T-1249, la reducción promedio desde la línea basal varió de 0,29 a 1,96 copias log/ml (Gulick 2002).

55 Se describen en el presente documento proteínas de fusión de transferrina que comprenden T-20, T-1249 o análogos de las mismas con semivida aumentada y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden estas proteínas de fusión de transferrina para fines terapéuticos. Se contempla el uso de dichas proteínas de fusión como inhibidores de la transmisión retroviral humana y no humana, especialmente del VIH, a células no infectadas. Los retrovirus humanos cuya transmisión puede inhibirse por los péptidos incluyen, pero sin limitación todas las cepas de VIH-1 y VIH-2 y los virus de linfocitos T humanos (HTLV-I, II, III). Los retrovirus no humanos cuya transmisión puede inhibirse por los péptidos de la invención incluyen, pero sin limitación virus de la leucosis bovina, virus de sarcoma y leucemia felina, virus de leucemia y sarcoma de simio y virus de neumonía progresiva de ovejas.

60 Con respecto al VIH, la proteína de fusión de transferrina que comprende T-20, T-1249 o análogos de los mismos puede usarse como un producto terapéutico en el tratamiento del SIDA. Estas proteínas de fusión de transferrina pueden administrarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas que comprenden estas proteínas de fusión de transferrina se formulan y se administran por vía sistémica. Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 18<sup>a</sup> ed., 1990 Mack Publishing Co., Easton, Pa. Las vías adecuadas pueden incluir

administración oral, rectal, transmucosa o intestinal; suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares, por nombrar solo algunas. Más preferentemente, la administración es intravenosa. Para inyección, las proteínas de fusión de transferrina que comprenden T-20, T1249 o análogos de las mismas pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para dicha administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera para permear en la formulación. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

Además, la proteína de fusión de transferrina que comprende T-20, T1249 o análogos de la misma pueden usarse como una medida profiláctica en individuos previamente no infectados después de exposición aguda a un virus VIH. Los ejemplos de dicho uso profiláctico de los péptidos pueden incluir, pero sin limitación, prevención de la transmisión de virus de la madre al niño y otras situaciones en las que existe probabilidad de transmisión del VIH, tales como, por ejemplo, accidentes en situaciones de cuidados sanitarios en los que los trabajadores se exponen a productos sanguíneos que contienen VIH. Las proteínas de fusión de transferrina que comprenden T-20, T-1249 o análogos de las mismas en dichos casos pueden cumplir el papel de una vacuna profiláctica, en la que el hospedador induce anticuerpos contra las proteínas de fusión, que después actúan para neutralizar los virus VIH, por ejemplo, inhibiendo la infección por VIH adicional. La administración de las proteínas de fusión de transferrina como una vacuna profiláctica, por lo tanto, comprendería administrar a un hospedador una concentración de proteína de fusión de transferrina eficaz en la inducción de una respuesta inmunitaria que es suficiente para neutralizar el VIH, por ejemplo, inhibiendo la capacidad del VIH para infectar células. La concentración exacta dependerá del péptido específico en la proteína de fusión de transferrina para administrar, pero puede determinarse usando técnicas convencionales para ensayar el desarrollo de una respuesta inmunitaria que se conoce bien por los expertos en la materia. Las proteínas de fusión de transferrina para usar como vacunas se administran habitualmente por vía intramuscular.

Las dosificaciones eficaces de las proteínas de fusión de transferrina que comprenden T-20, T-1249 o análogos de las mismas para administrar pueden determinarse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia que abordan parámetros tales como semivida biológica, biodisponibilidad y toxicidad. Dados los datos presentados posteriormente en la Sección 6, DP-178, por ejemplo, puede demostrar ser eficaz *in vivo* a dosis requeridas para conseguir los niveles en circulación de 10 ng por ml de péptido.

Además, se contempla el uso de las proteínas de fusión de transferrina que comprenden T-20, T-1249 o análogos de las mismas para la fabricación de un producto medicinal para el tratamiento de enfermedades asociadas con la transmisión de un virus.

### Receptores de toxina solubles

También se describen en el presente documento proteínas de fusión que comprenden un receptor de toxina soluble y transferrina o transferrina modificada. Como se usa en el presente documento, el término "toxina" se refiere a una sustancia tóxica de origen biológico. Las proteínas de fusión que comprenden un receptor de toxina soluble pueden usarse para tratar a pacientes que padecen enfermedades asociadas con las toxinas. Dichas proteínas de fusión también pueden usarse para fines de diagnóstico.

Los ejemplos de toxinas incluyen, pero sin limitación, exotoxinas de *Pseudomonas* (PE), toxinas Diftéricas (DT), toxina ricina, toxina abrina, toxinas de carbunco, toxina shiga, toxina botulínica, toxina del tétanos, toxina del cólera, maitotoxina, palitoxina, ciguatoxina, textilotoxina, batracotoxina, alfa conotoxina, taipoxina, tetrodotoxina, titiustoxina alfa, saxitoxina, anatoxina, microcistina, aconitina, toxinas exfoliatinas A y B, enterotoxinas, toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1), toxina de *Y. pestis*, toxina de gangrena gaseosa y otras. Debido a la gravedad de las enfermedades que algunas de estas toxinas provocan y la facilidad de obtener algunas de ellas para guerra biológica, existe la necesidad de desarrollar métodos para obtener grandes cantidades de antitoxinas potentes a bajo coste.

Se contempla el uso de receptores de toxina solubles como antitoxinas para el tratamiento y prevención de enfermedades asociadas con diversas toxinas. Los receptores de toxinas son moléculas que se unen con una toxina específica. Un receptor de toxina soluble es uno que es capaz de disolverse. Habitualmente los péptidos o fragmentos de un receptor son solubles.

De forma similar a otros péptidos analizados anteriormente, estos péptidos tienen una semivida corta. Se describen en el presente documento proteínas de fusión que comprenden un péptido soluble de un receptor de toxina fusionado con una transferrina o molécula de transferrina modificada. La proteína de fusión resultante tiene una semivida aumentada en comparación con el péptido receptor de toxina soluble. La proteína de fusión también es fácil de producir en grandes cantidades por medios recombinantes. Ya que las propiedades de unión del péptido soluble no se han alterado, este se unirá con la toxina en circulación y evitará que la toxina se una con el receptor diana, inactivando de este modo la toxina. En consecuencia, la proteína de fusión es una potente antitoxina.

Se describe una composición farmacéutica que comprende un receptor de toxina soluble fusionado con transferrina o con transferrina modificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describe el uso de una proteína de fusión de transferrina que comprende un receptor de toxina soluble para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones asociadas con una toxina.

A diferencia de los anticuerpos que son difíciles y caros de producir en grandes cantidades, la presente proteína de fusión de transferrina/antitoxina es altamente potente y menos costosa de fabricar. Adicionalmente, no se espera que la inmunización mantenga los títulos de anticuerpo requeridos para proteger en casos de exposición masiva después de un acto de bioterrorismo. No es realista que la población se inmunice a gran escala antes de una exposición.

### **Receptor de toxina de *Bacillus anthracis***

La toxina del carbunco es un agente bien conocido de guerra biológica derivado de *Bacillus anthracis*. El *Bacillus anthracis* produce tres proteínas que cuando se combinan de forma apropiada forman dos potentes toxinas, designadas colectivamente toxina del carbunco. El antígeno protector (PA, 82.684 Da (Dalton)) y el factor de edema (EF, 89.840 Da) se combinan para formar la toxina de edema (ET), mientras que PA y el factor letal (LF, 90.237 Da) se combinan para formar toxina letal (LT) (Leppla, S. H. Alouf, J. E. y Freer, J. H., eds. Academic Press, Londres 277-302, 1991). ET y LT se ajustan cada una al modelo de toxina de AB, proporcionando PA la función de unión a célula diana (B) y actuando EF o LF como los restos efectores o catalíticos (A). Una característica única de estas toxinas es que LF y EF no tienen toxicidad en ausencia de PA, aparentemente debido a que no pueden conseguir acceder al citosol de células eucariotas.

Recientemente, se han identificado en células dos de las dianas del factor letal (LF). El LF es una metaloproteasa que escinde específicamente las proteínas Mek1 y Mek2, quinasas que son parte de la ruta de señalización de MAP-quinasa. La actividad proteolítica del LF inactiva la cascada de señalización de MAP-quinasa a través de la escisión de la proteína quinasa quinasa activadas por mitógeno 1 o 2 (MEK1 o MEK2). (Leppla, S. A. En The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. J. E. Alouf y J. H. Freer, Eds. 2ª edición, San Diego, Academic Press, 1999; pp 243-263.).

PA es capaz de unirse con la superficie de muchos tipos de células. Después de que PA se una con un receptor específico (Leppla, mencionado anteriormente, 1991) en la superficie de células susceptibles, se escinde en un único sitio por una proteasa de superficie celular, probablemente furina, para producir un fragmento de 19 kDa amino terminal que se libera del complejo de receptor/PA (Singh *et al.*, J. Biol. Chem. 264: 19103-19107, 1989). La eliminación de este fragmento de PA expone un sitio de unión de alta afinidad para LF y EF en el fragmento carboxilo terminal de 63 kDa unido a receptor (PA63). El complejo de PA63 y LF o EF entra en las células y probablemente pase a través de endosomas ácidos hasta alcanzar el citosol.

PA, el componente de unión celular, no tóxico, de la toxina, es el componente esencial de la vacuna humana disponible en la actualidad. La vacuna se produce habitualmente a partir de cultivos discontinuos de la cepa Sterne de *B. anthracis*, que aunque no es virulento, aún es necesario manipular como un patógeno de Clase III. Además del PA, la vacuna contiene pequeñas cantidades de los restos de toxina de carbunco, factor de edema y factor letal, y una serie de proteínas derivadas de cultivo. Todos estos factores contribuyen a la reactogenicidad registrada de la vacuna en algunos individuos. La vacuna es cara y requiere un ciclo de seis meses de cuatro vacunaciones. Además, las presentes pruebas sugieren que esta vacuna puede no ser eficaz contra exposición por inhalación con ciertas cepas (M. G. Broster *et al.*, Proceedings of the International Workshop on Anthrax, Abr. 11-13, 1989, Winchester RU. Salisbury med Bull Supl N° 68, (1990) 91-92).

Bradley *et al.* (Nature, 2001,414: 225-229) desvelan la clonación del receptor de carbunco humano que se une a PA. El receptor, ATR (receptor de toxina de carbunco) es una proteína de membrana de tipo I que consiste en 368 aminoácidos. La proteína tiene un péptido señal predicho de 27 aminoácidos, un dominio extracelular de 293 aminoácidos que contiene tres sitios de glucosilación ligados a N potenciales, unan región transmembrana potencial de 23 aminoácidos y una cola citoplasmática corta de 25 aminoácidos. Una característica notable de ATR es que el dominio extracelular consiste en un dominio de factor de von willebrand de tipo A (VWA) que se sabe que es importante en las interacciones proteína-proteína. Este dominio VWA se localiza en los aminoácidos 44 a 216. Se ha mostrado que una versión soluble de ATR que comprende los aminoácidos 41-227 se une a la toxina del carbunco. En consecuencia, el dominio VWA de ATR se une directamente a PA.

Se describe en el presente documento una antitoxina de carbunco que comprende el dominio extracelular de ATR fusionado con transferrina o una molécula de transferrina modificada. También se describen proteínas de fusión que comprenden fragmentos de las mismas del dominio extracelular de ATR que se une a PA fusionado con transferrina o molécula de transferrina modificada. Se contemplan proteínas de fusión que comprenden miméticos moleculares pequeños del dominio extracelular de ATR que se une a PA fusionado con transferrina o molécula de transferrina modificada.

### Toxina de *Clostridium botulinum*

Las neurotoxinas clostridiales son la sustancia más venenosa. Los seres humanos se exponen a la neurotoxina producida por *Clostridium tetani* (toxina del tétanos) como resultado de heridas. Aunque la toxina del tétanos sigue siendo un problema de salud pública grave en países en desarrollo en todo el mundo, casi todas las personas en el mundo occidental están protegidas de la toxina del tétanos como consecuencia de inmunizaciones en la infancia. Los seres humanos habitualmente entran en contacto con la neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* (toxina botulínica) a través de intoxicación alimentaria. Sin embargo, hay incidentes poco comunes de botulismo por herida e infección de colonización de neonatos conocido como botulismo infantil. Ya que la intoxicación botulínica es poco habitual, la inmunización de la población general no está justificada basándose en el coste y las tasas desesperadas de reacción adversa a la vacuna. Por lo tanto, los seres humanos no están protegidos de las toxinas botulínicas. Adicionalmente, estas toxinas son relativamente de producir. En consecuencia, las toxinas botulínicas son probables agentes de guerra biológica.

Como se ha analizado, la bacteria gram positiva, anaerobia, *Clostridium botulinum* produce la neurotoxina biológica más venenosa conocida con una dosis humana letal en el intervalo de nanogramos. El efecto de la toxina varía de enfermedades diarreicas que pueden provocar destrucción del colon, hasta efectos paralíticos que pueden provocar la muerte. Las esporas de *Clostridium botulinum* se encuentran en el suelo y pueden crecer en recipientes alimentarios sellados y esterilizados de forma inapropiada de conservas caseras, que son la causa de muchos de los casos de botulismo. Los síntomas de botulismo normalmente aparecen de 18 a 36 horas después de consumir los productos alimentarios infectados con un cultivo de *Clostridium botulinum* o esporas. La toxina botulínica puede pasar aparentemente sin atenuación a través del revestimiento del intestino y atacar a neuronas motoras periféricas. Los síntomas de intoxicación por toxina botulínica pueden progresar de dificultad al andar, al tragar y al hablar hasta parálisis de los músculos respiratorios y la muerte.

La enfermedad del botulismo puede agruparse en cuatro tipos, basándose en el método de introducción de la toxina en el torrente sanguíneo. El botulismo portado por alimentos resulta de la ingestión de alimentos conservados de forma inapropiada y calentados de forma inadecuada que contienen toxina botulínica (es decir, la toxina está preformada antes de la ingestión). El botulismo inducido por heridas resulta de *C. botulinum* que penetra en tejido traumático y que produce toxina que se absorbe en el torrente sanguíneo. Desde 1950, se han indicado treinta casos de botulismo por heridas (Swartz, "Anaerobic Spore-Forming Bacilli: The Clostridia", pp. 633-646, en Davis *et al.*, (eds.), Microbiology, 4ª edición, J. B. Lippincott Co. (1990)). El botulismo por inhalación resulta cuando la toxina se inhala. El botulismo por inhalación se ha indicado como resultado de exposición accidental en el laboratorio (Holzer, Med. Klin., 41: 1735 [1962]) y es un peligro potencial si la toxina se usa como un agente de guerra biológica (Franz *et al.*, en Botulinum and Tetanus Neurotoxins, DasGupta (ed.), Plenum Press, Nueva York [1993], pp. 473-476). El botulismo infantil infeccioso resulta de la colonización por *C. botulinum* del intestino infantil con producción de toxina y su absorción en el torrente sanguíneo.

Diferentes cepas de *Clostridium botulinum* producen cada una una toxina antigénicamente distinta designada por las letras A-G. La toxina de serotipo A se ha implicado en el 26 % de los casos de botulismo alimentario; los tipos B, E y F también se han implicado en un porcentaje menor de los casos de botulismo alimentario (Sugiyama, Microbiol. Rev., 44: 419 (1980)). Se ha indicado que el botulismo por heridas está provocado solamente por las toxinas de tipo A o B (Sugiyama, mencionado anteriormente). Casi todos los casos de botulismo infantil han sido provocados por bacterias que producen toxina de tipo A o de tipo B (excepcionalmente, un caso de Nuevo México estuvo provocado por *Clostridium botulinum* que produce toxina de tipo F y otro por *Clostridium botulinum* que produce un híbrido de tipo B-tipo F) (Arnon, Epidemiol. Rev., 3: 45 (1981)). La toxina de tipo C afecta a aves acuáticas, vacas, caballos y visón. La toxina de tipo D afecta a vacas y la toxina de tipo E afecta tanto a seres humanos como a aves.

La neurotoxina *Clostridium botulinum* actúa en las terminaciones nerviosas para bloquear la liberación de acetilcolina. La unión de la neurotoxina con un receptor de membrana a través de su cadena pesada es la primera etapa esencial en su modo de acción de toxina. Li *et al.* (J Nat Toxins 1998, 7(3): 215-26) purificaron neurotoxina botulínica de Tipo E (BoNT/E) o neurotoxina botulínica de tipo A (BoNT/A) a partir de sinaptosomas de cerebro de rata empleando una cromatografía de columna de afinidad de neurotoxina. La fracción proteica eluida de la columna de afinidad con NaCl 0,5 M contenía una proteína de 57 kDa como un eluyente principal. La inmunotransferencia del eluyente con anticuerpos anti sinaptotagmina reveló que la proteína de 57 kDa era sinaptotagmina I. Se ha sugerido la sinaptotagmina I de rata como receptor para BoNT/B (Nishiki *et al.*, J. Biol. Chem. 269, 10498-10503, 1994) en cerebro de rata. Li *et al.* investigaron la unión de BoNT/A y BoNT/E con sinaptotagmina I por un método basado en placas de microtitulación. La unión de sinaptotagmina I con BoNT/A recubriendo la placa se redujo competitivamente tras preincubación de las proteínas con BoNT/E, lo que sugiere una unión competitiva de BoNT/A y BoNT/E con el receptor. Tomados juntos, estos resultados sugieren que la misma proteína receptora se une a los tres serotipos de BoNT ensayados.

La sinaptotagmina I es un receptor de acción general de neurotoxina de *Clostridium botulinum* serotipos A, B y E y posiblemente C, D, F y G. Se localiza en la célula neuronal motora. El fragmento N terminal de sinaptotagmina I, los aminoácidos 1-53 (SEC ID N°: 4), es responsable de la unión con los diversos serotipos de neurotoxinas. La unión media en la translocación de neurotoxina a la célula y bloquea la liberación de neurotransmisores lo que da como

resultado la parálisis y en casos extremos la muerte. El fragmento N terminal puede producirse por medios recombinantes y usarse para unir neurotoxinas en circulación. La unión del fragmento con la neurotoxina evita que la neurotoxina se una con su receptor diana lo que da como resultado neutralización de la toxina.

5 Se describe en el presente documento una antitoxina de *Clostridium botulinum* con semivida significativamente aumentada en comparación con el fragmento de 53 aminoácidos producido de forma recombinante, de modo que la antitoxina tenga suficiente tiempo para encontrar y unirse con las neurotoxinas a medida que entren en la circulación. También se describe una proteína de fusión que comprende el fragmento de 53 aminoácidos N terminal de sinaptotagmina I fusionado con transferrina o transferrina modificada, aumentando de este modo la semivida del  
10 fragmento sin alterar las propiedades de unión del fragmento. Como alternativa, el fragmento podría pegarse químicamente para prolongar la vida en circulación. La semivida más larga de la antitoxina hará a una dosis dada más eficaz. A diferencia de los anticuerpos, la presente proteína de fusión antitoxina es de acción amplia y se une a varios serotipos de neurotoxina, específicamente neurotoxina A, B y E.

15 La proteína de fusión puede producirse en un sistema de producción microbiana altamente eficaz que puede proporcionar grandes cantidades de la antitoxina a un coste razonable para tratar a la población después de exposición masiva en actos de bioterrorismo. Esta proteína de fusión también puede usarse de un modo profiláctico antes de la exposición.

20 También se contemplan antitoxinas que comprenden fragmentos peptídicos de aminoácidos 1-53 de sinaptotagmina I o moléculas pequeñas miméticas de los aminoácidos 1-53 de sinaptotagmina I fusionados con transferrina o molécula de transferrina modificada.

La proteína de fusión también puede usarse para bloquear la propagación del botulismo a través de alimentos o  
25 contaminación aérea entre la población civil.

La proteína de fusión antitoxina pudo usarse para tratar el botulismo por heridas resultante de uso de drogas y sobredosisación accidental de neurotoxina botulínica después de tratamiento de diversas enfermedades tales como distonía de miografía e hiperhidrosis.  
30

La proteína de fusión antitoxina puede usarse para tratar el botulismo de intoxicación alimentaria.

### **Receptor de toxina diftérica**

35 La difteria está provocada por una bacteria, *Corynebacterium diphtheria*, que normalmente infecta las membranas mucosas: la nariz y la garganta son lugares favoritos para que arraigue la infección, pero también pueden infectarse membranas mucosas de los ojos o los genitales. Las bacterias producen una toxina que provoca daño a tejido tanto en el sitio de la infección original como en otras partes del cuerpo una vez que la toxina se propaga a través del torrente sanguíneo. Los efectos más graves de la toxina diftérica son en el corazón (daño muscular que conduce a  
40 pérdida de capacidad de bombeo), riñones y el sistema nervioso.

La difteria puede tratarse proporcionando penicilina u otros antibióticos para destruir la bacteria, y antitoxina para eliminar la toxina libre en el cuerpo. Sin embargo, la antitoxina no eliminará la toxina que ya se ha unido a células y ha comenzado a dañarlas. El mejor enfoque es proporcionar toxoide para estimular la inmunidad a la toxina,  
45 permitiendo de esta manera al cuerpo eliminar la toxina en cuanto aparezca. La inmunidad a una toxina bacteriana tal como toxina diftérica (DT) puede adquirirse de forma natural durante el transcurso de una infección, o artificialmente mediante inyección de una forma destoxificada de la toxina (es decir, un toxoide) (Germanier, ed., Bacterial Vaccines, Academic Press, Orlando, Fla., 1984). Los toxoides se han preparado tradicionalmente por modificación química de toxinas nativas (por ejemplo, con formalina o formaldehído (Lingood *et al.*, Brit. J. Exp. Path. 44: 177, 1963)), haciéndolas no tóxicas conservando al mismo tiempo una antigenicidad que protege al animal  
50 vacunado contra exposiciones posteriores a la toxina natural: un ejemplo de una DT inactivada químicamente es el descrito en Michel y Dirx (Biochem. Biophys. Acta 491: 286-295, 1977), en el que Trp-153 del Fragmento A es el resto modificado. El toxoide se proporciona inicialmente a las edades de 2, 4 y 6 meses, de nuevo a las edades de 18 meses y 5 años, y regularmente cada 10 años a continuación.

55 Durante varios años ha parecido que la difteria ya no era una amenaza importante para la salud pública. Sin embargo, recientemente, ha habido una reaparición de difteria en los Nuevos Estados Independientes de la antigua Unión Soviética, Ecuador, Tailandia, Argelia y otros países. Aunque los pacientes con difteria se han tratado con antitoxina equina, que neutraliza la toxina no unida, los pacientes supervivientes han desarrollado con frecuencia enfermedad del suero, una enfermedad de tipo complejo inmunitario. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar  
60 un mejor tratamiento para pacientes con difteria.

La molécula de DT se produce como un único polipéptido de 535 aminoácidos que se cortan y empalman fácilmente para formar dos subunidades unidas por un enlace disulfuro, el Fragmento A (N terminal de aproximadamente 21  
65 kDa) y el Fragmento B (C terminal de aproximadamente 37 kDa), como resultado de la escisión en el resto 190, 192 o 193 (Moskaug, *et al.*, Biol Chem 264: 15709-15713, 1989; Collier *et al.*, Biol Chem, 246: 1496-1503, 1971). El

Fragmento A es la parte catalíticamente activa de DT. Es una ADP-ribosiltransferasa dependiente de NAD que se dirige específicamente a un factor de síntesis de proteínas denominado factor de elongación 2 (EF-2), inactivando de este modo EF2 y deteniendo la síntesis de proteínas en la célula. El Fragmento A consiste en el dominio C de toxina diftérica. El Fragmento A se une al Fragmento B de toxina diftérica por un bucle polipeptídico. El Fragmento B de DT posee un dominio de unión a receptor (el dominio R) que reconoce y une la molécula de toxina a una estructura receptora particular hallada en las superficies de muchos tipos de células de mamífero. Una vez que la DT se ha unido a la célula mediante esta estructura receptora, el complejo de receptor/DT se capta por la célula mediante endocitosis mediada por receptor. Una segunda región funcional en el Fragmento B (el dominio T) actúa para traslocar DT a través de la membrana de la vesícula endocítica, liberando el Fragmento A catalíticamente activo al citosol de la célula. Una única molécula del Fragmento A es suficiente para inactivar la maquinaria de síntesis de proteínas en una célula dada.

Naglich *et al.* (Cell, 1992, 69: 1051-1061) describen la clonación de expresión del receptor de la toxina diftérica a partir de células Vero de mono muy sensibles a la toxina. Se descubrió que la secuencia de aminoácidos del receptor era idéntica a la del precursor del factor de crecimiento de tipo factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina expresado en la superficie celular (HB-EGF) (proHB-EGF). Aunque proHB-EGF se escinde y libera como HB-EGF maduro soluble (Goishi *et al.*, Mol. Biol. Cell, 1995, 6: 967-980), una cantidad significativa de proHB-EGF permanece en la superficie celular y actúa como un factor de crecimiento yuxtacrino (Hagashiyama *et al.*, Science, 251: 929-938) y como un receptor de DT (Iwamoto *et al.*, EMBO J., 1994, 13: 2322-2330; Naglich *et al.*, Cell, 1992, 69: 1051-1061).

Hooper *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, 206: 710-717) muestran que HB-EGF humano maduro recombinante que consiste en los restos 63-148 (el dominio extracelular o el factor de crecimiento maduro) inhibe fuertemente la unión de DT radiomarcada con células portadoras de receptores de toxina. Este resultado sugiere que sería posible tratar a pacientes con difteria con HB-EGF maduro, un factor de crecimiento natural que no provocará enfermedad del suero. Sin embargo, el HB-EGF maduro podría producir efectos secundarios debido a su actividad de factor del crecimiento.

Cha *et al.* (Infection and Immunity, 2002, 70(5): 2344-2350) desarrollaron un tratamiento basado en precursor de HB-EGF/receptor de DT humano. Enseñan un HB-EGF truncado recombinante, que consiste en los restos 106-149 y que carece de la mayor parte del dominio de unión a heparina, capaz de inhibir la unión de DT radioyodada con células. Además, se ha mostrado que era un inhibidor más eficaz de la unión de DT que el HB-EGF maduro recombinante. Además los investigadores mutaron algunos restos en el dominio de tipo EGF del HB-EGF truncado recombinante para destruir algo de su efecto mitógeno. Se ha demostrado que el análogo del receptor (I117A/L148A) presentaba un bajo efecto mitógeno. La proteína de HB-EGF truncada (I117A/L148A) conservaba alta afinidad de unión a DT. El trabajo de Cha *et al.* sugirió que la proteína de HB-EGF truncada (I117A/L148A) podría ser una antitoxina segura para el receptor de EGF.

Se describen en el presente documento proteínas de fusión antitoxina que comprenden proteína HB-EGF truncada (I117A/L148A) fusionada con transferrina o transferrina modificada. También se describen las proteínas de fusión de transferrina/antitoxina que comprenden fragmentos de las mismas de proteína de HB-EGF truncada (I117A/L148A) que se unen con DT y tienen actividad mitógena mínima. Adicionalmente, se describen proteínas de fusión de transferrina/antitoxina que comprenden análogos de proteína de HB-EGF truncada que se une a DT y tiene actividad mitógena mínima.

#### Otros receptores de toxina

La bacteria *Bacillus thuringiensis* (BT) produce proteínas bactericidas que son tóxicas para una serie limitada de insectos, principalmente los órdenes Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros. Se han usado toxinas BT para combatir plagas, aplicando *Bacillus thuringiensis* a plantas o plantas transformantes en sí mismas de modo que generen las toxinas según su carácter transgénico. Las toxinas en sí mismas son productos glucoproteicos del gen cry como se describe en Hofte, H. *et al.* Microbiol Rev (1989) 53: 242. La Patente de Estados Unidos 5.693.491 desvela el ADNc que codifica un receptor de glucoproteína del gusano de cuerno del tabaco que se une a una toxina de *Bacillus thuringiensis*. La disponibilidad de este ADNc permite la recuperación de ADN que codifican receptores homólogos en otros insectos y organismos así como el diseño de ensayos con respecto a la citotoxicidad y la afinidad de unión de pesticidas potenciales y el desarrollo de métodos para manipular receptores homólogos naturales y/o introducidos y, por lo tanto, para destruir células, tejidos y/u organismos diana.

La mayoría de los candidatos a vacuna de *Vibrio cholerae* construidos suprimiendo el gen de ctxA que codifica la toxina del cólera (CT) son capaces de inducir altas respuestas de anticuerpos, pero más de la mitad de las vacunas aún desarrollan diarrea leve (Levine *et al.*, Infect. Immun., 56(1): 161-167 (1988)). Dada la magnitud de la diarrea inducida en ausencia de CT, se ha planteado la hipótesis de que *V. cholerae* producen otros factores enterotoxigénicos, que aún están presentes en cepas con la secuencia ctxA suprimida (Levine *et al.*, mencionado anteriormente). Como resultado, se ha descubierto una segunda toxina, toxina de zonula occludens (en lo sucesivo en el presente documento "ZOT") elaborada por *V. cholerae*, y que contribuye a la diarrea residual (Fasano *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 8: 5242-5246 (1991)). El gen de zot se localiza inmediatamente adyacente a los genes

ctx. El alto porcentaje de concurrencia del gen de zot y los genes de ctx entre cepas de *V. cholerae* (Johnson *et al.*, J. Clin. Microb., 31/3: 732-733 (1993); y Karasawa *et al.*, FEBS Microbiology Letters, 106: 143-146 (1993)) sugiere un posible papel sinérgico de ZOT en la causalidad de diarrea deshidratante aguda típica del cólera. El gen zot también se ha identificado en otros patógenos entéricos (Tschape, 2nd Asian-Pacific Symposium on Typhoid fever and other Salomellosis, 47(Resumen) (1994)). La Patente de Estados Unidos 5.864.014 desvela el receptor purificado para toxina de zonula occludens.

La diarrea puede estar provocada por toxinas peptídicas pequeñas, termoestables (ST) producidas por diversas bacterias patógenas (Thompson, M. R., 1987, Pathol. Immunopathol. Res. 6, 103-116). En países en desarrollo, dichas toxinas pueden ser responsables del 50 % al 80 % de los casos indicados de diarrea (Giannella, R. A., 1981, Ann. Rev. Med. 32, 341-357). Las ST también son una causa importante de diarrea en animales de laboratorio y domésticos (Burgess *et al.*, 1978, Infect. Immun. 21, 526-531). Se ha mostrado que las enterotoxinas termoestables se unen con un receptor de superficie celular en el intestino que posteriormente conduce a una activación de guanilil ciclasa (Field *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2800-2804; Guerrant *et al.*, 1980, J. Infectious Diseases 142, 220-228). El aumento de GMP cíclico estimula después la secreción de fluidos provocando de este modo diarrea. Se ha indicado que el receptor de ST es una proteína claramente distinta de la guanilil ciclasa basándose en separación cromatográfica parcial de una proteína de unión a ST solubilizada con detergente de la actividad guanilil ciclasa (Kuno *et al.*, 1986, J. Biol. Chem. 261, 1470-1476; Waldman, *et al.*, 1986, Infect. Immun. 51, 320-326). El documento U.S. 5.237.051 desvela la clonación del ácido nucleico que codifica el receptor intestinal que reconoce enterotoxinas termoestables y tiene actividad guanilil ciclasa. Los datos muestran que el receptor se une a enterotoxina y señalizan normalmente a través del sistema de segundo mensajero de GMP cíclico.

La septicemia está provocada más habitualmente por infección o traumatismo inducido por una toxina. Los síntomas iniciales de septicemia incluyen escalofríos, sudor abundante, fiebre remitente de forma irregular, postración y similares, seguido de fiebre persistente, hipotensión que conduce a choque, neutropenia, leucopenia, coagulación intravascular diseminada, síndrome de dificultad respiratoria del adulto e insuficiencia orgánica múltiple. Se han descubierto toxinas inductoras de septicemia asociadas con bacterias patógenas, virus, plantas y venenos. Entre las toxinas bacterianas bien descritas están las endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram negativas. Estas moléculas son glucolípidos que son ubicuos en la membrana externa de todas las bacterias gram negativas. Se ha indicado que CD14 fijado en membrana actúa como un receptor para el complejo de endotoxina unida a proteína (LPS) y media en los efectos celulares de la endotoxina (Wright *et al.*, 1990, Science, 249: 1431). CD14 soluble truncado en el aminoácido 71 (N71) contiene la secuencia de unión a lipopolisacáridos. Se ha mostrado que N71 neutraliza LPS en circulación, es decir, que actúa como un antagonista de endotoxina (Higuchi *et al.*, Pathobiology, 2002, 70: 103).

#### Métodos para suministrar proteína de fusión antitoxina

Las proteínas de fusión antitoxina pueden basarse en una única jeringa de pistón con dos cámaras contiguas. La primera cámara contendrá diluyente y la segunda contendrá la proteína de fusión antitoxina liofilizada. A medida que se presiona el émbolo hacia abajo el diluyente se conducirá a la siguiente cámara para disolver la proteína de fusión antitoxina que se expulsará a través de una aguja para suministro intramuscular directo. El diluyente puede contener un anticongelante tal como glicerol para actuar en condiciones de congelación. El producto liofilizado permanecerá estable en condiciones tropicales.

Se contempla el suministro de las proteínas de fusión antitoxina descritas en el presente documento de esta manera a soldados que entran en una situación de combate en la que el riesgo de exposición a toxinas es alto. La proteína de fusión antitoxina puede usarse para tratamiento inmediato en el campo de batalla y como un producto profiláctico antes de entrar en el campo de batalla.

#### Ácidos nucleicos

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión de transferrina que comprenden una proteína de transferrina modificada unida a una proteína GLP-1. La proteína de fusión puede comprender además una región enlazadora, por ejemplo un enlazador menor de aproximadamente 50, 40, 30, 20 o 10 restos de aminoácidos. El enlazador puede unirse covalentemente con y estar entre la proteína de transferrina o parte de la misma y la proteína terapéutica, preferentemente la proteína terapéutica. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden estar purificadas o no.

También se proporcionan células hospedadoras y vectores para replicar las moléculas de ácido nucleico para expresar las proteínas de fusión codificadas. Puede usarse cualquier vector o célula hospedadora, bien procarionta o bien eucariota, pero pueden preferirse sistemas de expresión eucariotas, en particular sistemas de expresión de levadura. Muchos vectores y células hospedadoras se conocen en la técnica para dichos fines. Está dentro de la experiencia de la técnica seleccionar un conjunto apropiado para la aplicación deseada.

Pueden clonarse secuencias de ADN que codifican transferrina, partes de transferrina y proteínas de GLP-1 de interés a partir de diversas bibliotecas genómicas o de ADNc conocidas en este campo. Las técnicas para aislar

dichas secuencias de ADN usando métodos basados en sondas son técnicas convencionales y se conocen bien por los expertos en la materia. Las sondas para aislar dichas secuencias de ADN pueden basarse en secuencias de ADN o proteínas publicadas (véase, por ejemplo, Baldwin, G. S. (1993) Comparison of Transferrin Sequences from Different Species. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B/1: 203-218 y todas las referencias citadas en el mismo).

5 Como alternativa, puede usarse el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desvelado en Mullis *et al.* (Patente de Estados Unidos Nº 4.683.195) y Mullis (Patente de Estados Unidos Nº 4.683.202). La elección de biblioteca y selección de sondas para el aislamiento de dichas secuencias de ADN están dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica.

10 Como se conoce en la técnica la "similitud" entre dos polinucleótidos o polipéptidos se determina comparando la secuencia de nucleótidos o aminoácidos y sus sustitutos de nucleótidos o aminoácidos conservados de un polinucleótido o polipéptido con la secuencia de un segundo polinucleótido o polipéptido. También se conoce en la técnica la "identidad" que significa el grado de relación de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o dos polinucleotídicas como se determina por la identidad de la coincidencia entre dos cadenas de dichas secuencias. Tanto la identidad como la similitud pueden calcularse fácilmente (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991).

25 Aunque existen varios métodos para mediar la identidad de similitud entre dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, los términos "identidad" y "similitud" se conocen bien por los expertos en la materia (*Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988)). Los métodos empleados habitualmente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, los desvelados en *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.* 48: 1073 (1988).

30 Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las dos secuencias ensayadas. Están codificados en programas informáticos métodos para determinar la identidad y similitud. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, paquete de programas GCG (Devereux, *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403 (1990)). El grado de similitud o identidad indicado anteriormente se determina como el grado de identidad entre las dos secuencias, lo que indica con frecuencia una derivación de la primera secuencia con respecto a la segunda. El grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse por medios de programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programas de GCG (Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970)). Para fines de determinar el grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico para la presente invención, se usa GAP con los siguientes ajustes: penalización de creación de hueco de 5,0 y penalización de extensión de hueco de 0,3.

### Optimización de codones

45 La degradación del código genético permite variaciones de la secuencia de nucleótidos de una proteína transferrina y/o proteína terapéutica de interés, produciendo al mismo tiempo un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica al polipéptido codificado por la secuencia de ADN nativa. El procedimiento, conocido como "optimización de codones" (descrito en la Patente de Estados Unidos 5.547.871) proporciona un medio para diseñar dicha secuencia de ADN alterada. El diseño de los genes con codones optimizados debería tener en cuenta diversos factores, incluyendo la frecuencia de uso codónico en un organismo, frecuencias de vecinos más cercanos, estabilidad de ARN, el potencial de formación de estructuras secundarias, la vía de síntesis y las manipulaciones de ADN futuras pretendidas de ese gen. En particular, pueden usarse métodos disponibles para alterar los codones que codifican una proteína de fusión dada con los más fácilmente reconocidos por levadura cuando se usen sistemas de expresión de levadura.

55 La degradación del código genético permite que la misma secuencia de aminoácidos se codifique y traduzca de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, la leucina, serina y arginina están codificadas cada una por seis codones diferentes, mientras que vaina, prolina, treonina, alanina y glicina están codificadas cada una por cuatro codones diferentes. Sin embargo, la frecuencia de uso de dichos codones sinónimos varía de genoma a genoma entre eucariotas y procariotas. Por ejemplo, los patrones de elección de codón sinónimos entre mamíferos son muy similares, mientras que organismos evolutivamente distantes tales como levadura (tal como *S. cerevisiae*), bacterias (tales como *E. coli*) e insectos (tales como *D. melanogaster*) revelan un patrón claramente diferente de frecuencias de uso codónico genómico (Grantham, R., *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 8,49-62 (1980); Grantham, R., *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 9, 43-74 (1981); Maroyama, T., *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 14, 151-197 (1986); Aota, S., *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 16,315-402 (1988); Wada, K., *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 19 Sup., 1981-1985 (1991); Kurland, C. G., *FEBS Lett.*, 285, 165-169 (1991)). Estas diferencias en los patrones de elección de codones parecen contribuir a los niveles de

expresión globales de genes individuales modulando las tasas de elongación de péptidos. (Kurland, C. G., FEBS Lett., 285, 165-169 (1991); Pedersen, S., EMBO J., 3, 2895-2898 (1984); Sorensen, M. A., J. Mol. Biol., 207, 365-377 (1989); Randall, L. L., *et al.*, Eur. J. Biochem., 107, 375-379 (1980); Curran, J. F., y Yarus, M., J. Mol. Biol., 209, 65-77 (1989); Varenne, S., *et al.*, J. Mol. Biol., 180, 549-576 (1984); Varenne, S., *et al.*, J. Mol. Biol., 180, 549-576 (1984); Garel, J.-P., J. Theor. Biol., 43, 211-225 (1974); Ikemura, T., J. Mol. Biol., 146, 1-21 (1981); Ikemura, T., J. Mol. Biol., 151, 389-409 (1981)).

Las frecuencias de uso codónico preferidas para un gen sintético deberían reflejar los usos codónicos de genes nucleares derivados del genoma exacto (o tan estrechamente relacionado como sea posible) de la célula/organismo que se pretende usar para expresión de proteínas recombinantes, particularmente la de una especie de levadura. Como se ha analizado anteriormente, en una realización preferida se optimizan los codones de la secuencia de Tf humana, antes o después de la modificación como se describe en el presente documento para expresión de levadura como puede ser la secuencia o las secuencias de nucleótidos de proteínas terapéuticas.

## 15 Vectores

Las unidades de expresión para su uso en la presente invención generalmente comprenderán los siguientes elementos, unidos operativamente en una orientación 5' a 3': un promotor transcripcional, una secuencia de señal secretora, una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión de Tf modificada que comprende proteína transferrina o una parte de una proteína transferrina unida con una secuencia de ADN que codifica una proteína o un péptido de interés de GLP-1 y un terminador de la transcripción. Como se ha analizado anteriormente, puede usarse cualquier disposición de la proteína o el péptido terapéutico fusionado con o dentro de la parte de Tf en los vectores de la invención. La selección de promotores, secuencias señal y terminadores adecuados se determinará por la célula hospedadora seleccionada y resultará evidente para un experto en la materia y se analizan más específicamente posteriormente.

Se describen vectores de levadura adecuados para su uso en la presente invención en la Patente de Estados Unidos 6.291.212 e incluyen YRp7 (Struhl *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1035-1039, 1978), YEp13 (Broach *et al.*, Gene 8: 121-133, 1979), pJDB249 y pJDB219 (Beggs, Nature 275: 104-108, 1978), pPPC0005, pSeCHSA, pScNHSA, pC4 y derivados de los mismos. Los vectores de plásmidos de levadura útiles también incluyen pRS403-406, pRS413-416 y los vectores de *Pichia* disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Estados Unidos. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración de levadura (YIps) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de Centrómero de Levadura (YCps).

Dichos vectores incluirán generalmente un marcador seleccionable, que puede ser uno de cualquier número de genes que muestren un fenotipo dominante para el que exista un ensayo fenotípico para permitir seleccionar transformantes. Son marcadores seleccionables preferidos los que complementan la auxotrofia de células hospedadoras, proporcionan resistencia a antibióticos o permiten que una célula utilice fuentes de carbono específicas, e incluyen *LEU2* (Broach *et al.* misma referencia), *URA3* (Botstein *et al.*, Gene 8: 17, 1979), *HIS3* (Struhl *et al.*, misma referencia) o *POT1* (Kawasaki y Bell, documento EP 171.142). Otros marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de CAT, que confiere resistencia a cloranfenicol en células de levadura. Los promotores preferidos para su uso en levadura incluyen promotores de genes glucolíticos de levadura (Hitzeman *et al.*, J Biol. Chem. 225: 12073-12080, 1980; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1: 419-434, 1982; Kawasaki, Patente de Estados Unidos N° 4.599.311) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young *et al.*, en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Hollaender *et al.*, (eds.), p. 355, Plenum, N. Y., 1982; Ammerer, Meth. Enzymol. 101: 192-201, 1983). A este respecto, son promotores particularmente preferidos el promotor de *TPI1* (Kawasaki, Patente de Estados Unidos N° 4.599.311) y el promotor de *ADH2-4<sup>C</sup>* (véase Patente de Estados Unidos 6.291.212) (Russell *et al.*, Nature 304: 652-654, 1983). Las unidades de expresión también pueden incluir un terminador de la transcripción. Un terminador de la transcripción preferido es el terminador de *TPI1* (Alber y Kawasaki, misma referencia). Otros vectores preferidos y componentes preferidos tales como promotores y terminadores de un sistema de expresión de levaduras se desvelan en las Patentes Europeas EP 0258067, EP 0286424, EP0317254, EP 0387319, EP 0386222, EP 0424117, EP 0431880 y EP 1002095; Publicaciones de Patentes Europeas EP 0828759, EP 0764209, EP 0749478 y EP 0889949; Publicación de PCT WO 00/44772 y WO 94/04687; y Patentes de Estados Unidos 5.739.007; 5.637.504; 5.302.697; 5.260.202; 5.667.986; 5.728.553; 5.783.423; 5.965.386; 6.150.133; 6.379.924; y 5.714.377.

Además de levadura, las proteínas de fusión modificadas de la presente invención pueden expresarse en hongos filamentosos, por ejemplo, cepas del hongo *Aspergillus*. Los ejemplos de promotores útiles incluyen los derivados de genes glucolíticos de *Aspergillus nidulans*, tales como el promotor de *adh3* (McKnight *et al.*, EMBO J. 4: 2093-2099, 1985) y el promotor de *tpiA*. Un ejemplo de un terminador adecuado es el terminador de *adh3* (McKnight *et al.*, misma referencia). Las unidades de expresión que utilizan dichos componentes pueden clonarse en vectores que son capaces de insertarse en el ADN cromosómico de *Aspergillus*, por ejemplo.

Los vectores de expresión de mamífero para su uso para llevar a cabo en la presente invención incluirán un promotor capaz de dirigir la transcripción de la proteína de fusión de Tf modificada. Los promotores preferidos

incluyen promotores virales y promotores celulares. Los promotores virales preferidos incluyen el promotor tardío principal de adenovirus 2 (Kaufman y Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 2: 1304-13199, 1982) y el promotor de SV40 (Subramani *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1: 854-864, 1981). Los promotores celulares preferidos incluyen el promotor de metalotioneína 1 de ratón (Palmiter *et al.*, *Science* 222: 809-814, 1983) y un promotor de V<sub>K</sub> de ratón (véase Patente de Estados Unidos 6.291.212) (Grant *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 15: 5496, 1987). Un promotor particularmente preferido es un promotor de V<sub>H</sub> de ratón (véase Patente de Estados Unidos 6.291.212) (Loh *et al.*, misma referencia). Dichos vectores de expresión también pueden contener un conjunto de sitios de corte y empalme de ARN localizados cadena abajo del promotor y cadena arriba de la secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de transferrina. Los sitios de corte y empalme de ARN preferidos pueden obtenerse de adenovirus y/o genes de inmunoglobulina.

También está contenida en los vectores de expresión una señal de poliadenilación localizada cadena abajo de la secuencia codificante de interés. Las señales de poliadenilación incluyen las señales de poliadenilación temprana o tardía de SV40 (Kaufman y Sharp, misma referencia), la señal de poliadenilación de la región 5 E1B del adenovirus y el terminador del gen de la hormona de crecimiento humana (DeNoto *et al.*, *Nucl. Acid Res.* 9: 3719-3730, 1981). Una señal de poliadenilación particularmente preferida es el terminador del gen de V<sub>H</sub> (véase Patente de Estados Unidos 6.291.212) (Loh *et al.*, misma referencia). Los vectores de expresión pueden incluir una secuencia líder viral no codificante, tal como el líder tripartito 2 de adenovirus, localizado entre el promotor y los sitios de corte y empalme de ARN. Los vectores preferidos también pueden incluir secuencias potenciadoras, tales como el potenciador de SV40 y el potenciador  $\mu$  de ratón (véase Patente de Estados Unidos 6.291.212) (Gillies, *Cell* 33: 717-728, 1983). Los vectores de expresión también pueden incluir secuencias que codifican los ARN de VA de adenovirus.

### Transformación

Se conocen bien en la bibliografía técnicas para transformar hongos, y se han descrito, por ejemplo, en Beggs (misma referencia), Hinnen *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929-1933, 1978), Yelton *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1740-1747, 1984) y Russell (*Nature* 301: 167-169, 1983). Pueden usarse otras técnicas para introducir secuencias de ADN clonadas en células fúngicas, tales como electroporación (Becker y Guarente, *Methods in Enzymol.* 194: 182-187, 1991). El genotipo de la célula hospedadora contendrá generalmente un defecto genético que se complementa por el marcador seleccionable presente en el vector de expresión. La elección de un hospedador particular y marcador seleccionable está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica.

Las secuencias de ADN clonadas que comprenden proteínas de fusión de Tf modificada de la invención pueden introducirse en células de mamífero cultivadas, por ejemplo, mediante transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler *et al.*, *Cell* 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1973). También pueden usarse otras técnicas para introducir secuencias de ADN clonadas en células de mamífero, tales como electroporación (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1: 841-845, 1982), o lipofección. Para identificar células que han integrado el ADN clonado, se introduce en general un marcador seleccionable en las células junto con el gen o ADNc de interés. Los marcadores seleccionables preferidos para su uso en células de mamífero cultivadas incluyen genes que confieren resistencia a fármacos, tales como neomicina, higromicina y metotrexato. El marcador seleccionable puede ser un marcador seleccionable amplificable. Un marcador seleccionable amplificable preferido es el gen de DHFR. Un marcador amplificable particularmente preferido es el ADNc de DHFR<sup>r</sup> (véase Patente de Estados Unidos 6.291.212) (Simonsen y Levinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2495-2499, 1983). Se revisan marcadores seleccionables en Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.) y la selección de marcadores seleccionables está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica.

### Células hospedadoras

La presente invención también incluye una célula, preferentemente una célula de levadura transformada para expresar una proteína de fusión de transferrina modificada de la invención. Además de las células hospedadoras transformadas en sí mismas, la presente invención también incluye un cultivo de esas células, preferentemente un cultivo monoclonal (clonalmente homogéneo), o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente. Si el polipéptido se secreta, el medio contendrá el polipéptido, con las células, o sin las células si se ha retirado por filtración o centrifugación.

Las células hospedadoras para su uso en la práctica de la presente invención incluyen células eucariotas, y en algunos casos células procariotas, capaces de transformarse o transfectarse con ADN exógeno y crecer en cultivo, tales como células de mamífero, de insectos, fúngicas, vegetales y bacterianas cultivadas.

Pueden usarse células fúngicas, incluyendo especies de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* spp., *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp.) como células hospedadoras dentro de la presente invención. Son ejemplos de hongos incluyendo levaduras que se ha contemplado que son útiles en la práctica de la presente invención como hospedadores para expresar la proteína de fusión de transferrina de la invención *Pichia* (algunas especies de las cuales se han clasificado anteriormente como *Hansenula*), *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Zygosaccharomyces*, *Debaromyces*,

*Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Humicola*, *Mucor*, *Neurospora*, *Yarrowia*, *Metschnikowia*, *Rhodosporidium*, *Leucosporidium*, *Botryosascus*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, y similares. Son ejemplos de *Saccharomyces* spp. *S. cerevisiae*, *S. italicus* y *S. rouxii*. Son ejemplos de *Kluyveromyces* spp. *K. fragilis*, *K. lactis* y *K. marxianus*. Una especie de *Torulaspota* adecuada es *T. delbrueckii*. Son ejemplos de *Pichia* spp. *P. angusta* (anteriormente *H. polymorpha*), *P. anomala* (anteriormente *H. anomala*) y *P. pastoris*.

Son células hospedadoras particularmente útiles para producir las proteínas de fusión de Tf de la invención las de *Pichia pastoris* metilotróficas (Steinlein *et al.* (1995) Protein Express. Purif. 6: 619-624). Se ha desarrollado *Pichia pastoris* hasta ser un hospedador excepcional para la producción de proteínas ajenas desde que se aisló y se clonó su promotor de alcohol oxidasa; su transformación se presentó en primer lugar en 1985. *P. pastoris* puede utilizar metanol como una fuente de carbono en ausencia de glucosa. El sistema de expresión de *P. pastoris* puede usar el promotor de alcohol oxidasa inducida por metanol (AOX1), que controla el gen que codifica la expresión de alcohol oxidasa, cuya enzima cataliza la primera etapa en el metabolismo del metanol. Este promotor se ha caracterizado e incorporado en una serie de vectores de expresión de *P. pastoris*. Ya que las proteínas producidas en *P. pastoris* normalmente se pliegan correctamente y se secretan al medio, la fermentación de *P. pastoris* modificada por ingeniería genética proporciona una excelente alternativa a sistemas de expresión de *E. coli*. Se han producido varias proteínas usando este sistema, incluyendo fragmento de toxina del tétanos, pertactina de *Bordetella pertussis*, albúmina de suero humano y lisozima.

Son otro hospedador preferido cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En una realización preferida, se usa una célula de levadura o, más específicamente, una célula hospedadora de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene una deficiencia genética en un gen requerido para glucosilación de glucoproteínas ligada a asparagina. Pueden prepararse células hospedadoras de *S. cerevisiae* que tienen dichos defectos usando técnicas convencionales de mutación y selección, aunque se han modificado muchas cepas de levadura disponibles para prevenir o reducir la glucosilación o hipermanosilación. Ballou *et al.* (J. Biol. Chem. 255: 5986-5991, 1980) han descrito el aislamiento de mutantes de biosíntesis de manoproteína que son defectuosos en genes que afectan a glucosilación ligada a asparagina. Gentzsch y Tanner (Glycobiology 7: 481-486, 1997) han descrito una familia de al menos seis genes (PMT1-6) que codifican enzimas responsables de la primera etapa en la O-glucosilación de proteínas en levadura. Los mutantes defectuosos en uno o más de estos genes muestran glucosilación ligada a O reducida y/o especificidad alterada de O-glucosilación.

Para optimizar la producción de las proteínas heterólogas, también se prefiere que la cepa hospedadora porte una mutación, tal como la mutación de pep4 de *S. cerevisiae* (Jones, Genetics 85: 23-33, 1977), lo que da como resultado actividad proteolítica reducida. Las cepas hospedadoras que contienen mutaciones en otras regiones codificantes de proteasa son particularmente útiles para producir grandes cantidades de las proteínas de fusión de Tf de la invención.

Se cultivan células hospedadoras que contienen construcciones de ADN de la presente invención en un medio de cultivo apropiado. Como se usa en el presente documento, la expresión "medio de cultivo apropiado" significa un medio que contiene nutrientes requeridos para el cultivo de células. Los nutrientes requeridos para el cultivo de células pueden incluir una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y factores de crecimiento. El medio de cultivo seleccionará generalmente células que contengan la construcción de ADN, por ejemplo, mediante selección de fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa por el marcador seleccionable en la construcción de ADN o se cotransfecta con la construcción de ADN. Se cultivan preferentemente células de levadura, por ejemplo, en un medio químicamente definido, que comprende una fuente de carbono, por ejemplo sacarosa, una fuente de nitrógeno no de aminoácidos, sales inorgánicas, vitaminas y complementos de aminoácidos esenciales. El pH del medio se mantiene preferentemente a un pH mayor de 2 y menor de 8, preferentemente a pH 5,5-6,5. Los métodos para mantener un pH estable incluyen tamponado y control de pH constante. Los agentes tamponantes preferidos incluyen ácido succínico y Bis-Tris (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Las células de levadura que tienen un defecto en un gen requerido para glucosilación ligada a asparagina se cultivan preferentemente en un medio que contiene un estabilizador osmótico. Un estabilizador osmótico preferido es sorbitol complementado en el medio a una concentración entre 0,1 M y 1,5 M., preferentemente a 0,5 M o 1,0 M.

Las células de mamífero cultivadas generalmente crecen en medio que contiene suero o sin suero disponible en el mercado. La selección de un medio apropiado para la línea celular particular usada está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. Se permite que las células de mamífero transfectadas crezcan durante un periodo de tiempo, normalmente 1-2 días, para comenzar a expresar la secuencia o las secuencias de ADN de interés. Después se aplica selección farmacológica para seleccionar el cultivo de células que expresan el marcador seleccionable de una manera estable. Para células que se han transfectado con un marcador seleccionable amplificable la concentración farmacológica puede aumentarse por etapas para seleccionar un número de copias aumentado de las secuencias clonadas, aumentando de este modo los niveles de expresión.

También pueden usarse sistemas de expresión de células de insectos/baculovirus para producir las proteínas de fusión de Tf modificadas de la invención. El Sistema de Expresión de Baculovirus BacPAK™ (BD Biosciences (Clontech)) expresa proteínas recombinantes a altos niveles en células hospedadoras de insectos. El gen diana se

inserta en un vector de transferencia, que se cotransfecta en células hospedadoras de insectos con el ADN viral de BacPAK6 linealizado. El ADN de BacPAK6 carece de una parte esencial del genoma del baculovirus. Cuando el ADN se recombina con el vector, el elemento esencial se restaura y el gen diana se transfiere al genoma de baculovirus. Después de la recombinación, se seleccionan y purifican varias placas virales, y se verifica el fenotipo recombinante. El virus recombinante recién aislado puede amplificarse después y usarse para infectar cultivos celulares de insectos para producir grandes cantidades de la proteína deseada.

También pueden producirse proteínas de fusión de Tf de la presente invención usando plantas y animales transgénicos. Por ejemplo, las ovejas y cabras pueden preparar la proteína terapéutica en su leche. Plantas de tabaco puede incluir la proteína en sus hojas. La producción tanto por plantas como por animales transgénicos de proteínas comprende añadir un nuevo gen que codifique la proteína de fusión al genoma del organismo. El organismo transgénico no solamente puede producir una nueva proteína, sino que también puede pasar esta capacidad a su descendencia.

### 15 **Secuencias señales secretoras**

Las expresiones “secuencia señal secretora” o “secuencia señal” o “secuencia líder de secreción” se usan indistintamente y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6.291.212 y Patente de Estados Unidos 5.547.871.

Las secuencias señal secretoras o secuencias señal o secuencias líder de secreción codifican péptidos secretores. Un péptido secretor es una secuencia de aminoácidos que actúa para dirigir la secreción de un polipéptido o una proteína madura de una célula. Los péptidos secretores se caracterizan en general por un núcleo de aminoácidos hidrófobos y se encuentran normalmente (pero no exclusivamente) en los extremos amino terminales de proteínas de nueva síntesis. Muy frecuentemente el péptido secretor se escinde de la proteína madura durante la secreción. Los péptidos secretores pueden contener sitios de procesamiento que permiten la escisión del péptido señal de la proteína madura a medida que pasa a través de la ruta secretora. Los sitios de procesamiento pueden estar codificados dentro del péptido señal o pueden añadirse al péptido señal, por ejemplo, por mutagénesis *in vitro*.

Pueden usarse péptidos secretores para dirigir la secreción de proteínas de fusión de Tf modificadas de la invención. Uno de dichos péptidos secretores que pueden usarse en combinación con otros péptidos secretores es la secuencia líder del factor de apareamiento alfa. Se requieren secuencias señal secretoras o secuencias líderes de secreción o secuencias señal para una serie compleja de etapas de procesamiento postraduccional que dan como resultado la secreción de una proteína. Si está presente una secuencia señal intacta, la proteína que se expresa entra en el lumen del retículo endoplásmico rugoso y después se transporta a través del aparato de Golgi a vesículas secretoras y se transporta finalmente fuera de la célula. En general, la secuencia señal está inmediatamente a continuación del codón de inicio y codifica un péptido señal en el extremo amino terminal de la proteína para secretar. En muchos casos, la secuencia señal se escinde por una proteasa específica, denominada una peptidasa señal. Las secuencias señal preferidas mejoran el procesamiento y eficacia de exportación de expresión de proteínas recombinantes usando vectores de expresión virales, de mamífero o de levadura. En algunos casos, la secuencia señal de Tf nativa puede usarse para expresar y secretar proteínas de fusión de la invención.

### **Enlazadores**

El resto de Tf y la proteína terapéutica de las proteínas de fusión de transferrina modificadas de la invención pueden fusionarse directamente o usando un péptido enlazador de diversas longitudes para proporcionar mayor separación física y permitir una mayor movilidad espacial entre las proteínas fusionadas y de este modo maximizar la accesibilidad de la proteína terapéutica, por ejemplo, para la unión con su receptor afín. El péptido enlazador puede consistir en aminoácidos que son flexibles o más rígidos. Por ejemplo, un enlazador tal como pero sin limitación un tramo de poliglicina. El enlazador puede ser de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 20 o 10 restos de aminoácidos. El enlazador puede estar unido covalentemente con y estar entre la proteína transferrina o parte de la misma y la proteína terapéutica.

### **Detección de proteínas de fusión de Tf**

Los ensayos para la detección de proteína de fusión de transferrina modificada biológicamente activa pueden incluir transferencia de Western, transferencia de proteínas o filtro de colonias así como ensayos basados en actividad que detectan la proteína de fusión que comprende transferrina y proteína terapéutica. Puede prepararse un filtro de transferencia de Western usando el método descrito en Towbin *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354, 1979). Brevemente, las muestras se someten a electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico. Las proteínas en el gel se transfieren electroforéticamente a papel de nitrocelulosa. Pueden prepararse filtros de transferencia de proteínas filtrando muestras de sobrenadantes o concentrados a través de filtros de nitrocelulosa usando, por ejemplo, un Minifold (Schleicher y Schuell, Keene, N. H.). Los filtros de colonias pueden prepararse cultivando colonias en un filtro de nitrocelulosa que se ha extendido sobre un medio de cultivo apropiado. En este método, se prefiere un medio sólido. Se permite que las células crezcan en los filtros durante al menos 12 horas. Las

células se retiran de los filtros lavando con un tampón apropiado que no retira las proteínas unidas a los filtros. Un tampón preferido comprende base Tris 25 mM, glicina 19 mM, pH 8,3, metanol al 20 %.

5 Las proteínas de fusión de transferrina de la presente invención pueden marcarse con un radioisótopo u otro agente de captura de imágenes y usarse para fines de diagnóstico *in vivo*. Los agentes de captura de imágenes radioisotópicos preferidos incluyen yodo 125 y tecnecio 99, prefiriéndose particularmente tecnecio 99. Se conocen bien en la técnica métodos para producir conjugados de proteína-isótopo, y se describen, por ejemplo, en Eckelman *et al.* (Patente de Estados Unidos N° 4.652.440), Parker *et al.* (documento WO 87/05030) y Wilber *et al.* (documento EP 203.764). Como alternativa, las proteínas de fusión de transferrina pueden unirse con potenciadores de marcadores de espín y usarse para captura de imágenes por resonancia magnética (RM). Los potenciadores de marcadores de espín adecuados incluyen compuestos de radicales libres, con impedimento estérico, estables, tales como nitróxidos. Se desvelan métodos para marcar ligandos para captura de imágenes por RM, por ejemplo, en Coffman *et al.* (Patente de Estados Unidos N° 4.656.026).

15 La detección de una proteína de fusión de transferrina de la presente invención puede facilitarse acoplando (es decir, uniendo físicamente) la proteína terapéutica con una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, fluorosceín isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

25 Cuando se ensaya con respecto a la capacidad de una proteína de fusión de transferrina de la invención para unirse o competir con un antígeno por la unión a un anticuerpo, pueden usarse diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo sándwich, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos, por ejemplo), transferencia de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. La unión de la proteína de fusión de transferrina puede detectarse detectando un marcador en la proteína de fusión de transferrina. La proteína de fusión de transferrina puede detectarse detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo que interacciona con la proteína de fusión de transferrina. Como alternativa, el anticuerpo secundario o reactivo está marcado. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo.

40 También pueden detectarse proteínas de fusión de la invención ensayando con respecto a la actividad del resto de proteína terapéutica. Específicamente, las proteínas de fusión de transferrina de la invención pueden ensayarse con respecto a actividad funcional (por ejemplo, actividad biológica o actividad terapéutica) usando ensayos conocidos por un experto habitual en la materia. Adicionalmente, un experto en la materia puede ensayar rutinariamente fragmentos de una proteína terapéutica correspondiente a una parte proteica terapéutica de una proteína de fusión de la invención, con respecto a actividad usando ensayos bien conocidos. Además, un experto en la materia puede ensayar de forma rutinaria fragmentos de una proteína transferrina modificada con respecto a actividad usando ensayos conocidos en la técnica.

50 Por ejemplo, cuando se ensaya con respecto a la capacidad de una proteína de fusión de transferrina de la invención para unirse con o competir con una proteína terapéutica con respecto a unión con un anticuerpo antipolipéptido terapéutico y/o anticuerpo antitransferrina, pueden usarse diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo sándwich, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos, por ejemplo), transferencias de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc. En un ejemplo, la unión del anticuerpo se detecta detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otro ejemplo, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. En un ejemplo adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen en la técnica muchos medios para detectar la unión en un inmunoensayo.

65 Cuando se identifica un compañero de unión (por ejemplo, un receptor o un ligando) de una proteína terapéutica, la unión de ese compañero de unión por una proteína de fusión de transferrina que contiene esa proteína terapéutica como la parte proteica terapéutica de la fusión puede ensayarse, por ejemplo, por medios bien conocidos en la

técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía en gel reductor y no reductor, cromatografía de afinidad de proteínas y transferencia de afinidad.

### **Producción de proteínas de fusión**

5 La presente invención proporciona además métodos para producir una proteína de fusión modificada de la invención usando moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. En términos generales, la producción de una forma recombinante de una proteína normalmente implica las siguientes etapas.

10 Se obtiene en primer lugar una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de transferrina de la invención. La molécula de ácido nucleico se coloca después preferentemente en unión operativa con secuencias de control adecuadas, como se ha descrito anteriormente, para formar una unidad de expresión que contiene la fase abierta de lectura de la proteína. La unidad de expresión se usa para transformar un hospedador adecuado y el hospedador transformado se cultiva en condiciones que permiten la producción de la proteína recombinante.

15 Opcionalmente la proteína recombinante se aísla del medio o de las células; la recuperación y purificación de la proteína puede no ser necesaria en algunos casos en los que pueden tolerarse algunas impurezas.

Cada una de las etapas anteriores puede conseguirse de diversas maneras. Por ejemplo, la construcción de vectores de expresión que son operativos en diversos hospedadores se consigue usando replicones y secuencias de control apropiados, como se ha expuesto anteriormente. Las secuencias de control, vectores de expresión y métodos de transformación dependen del tipo de célula hospedadora usada para expresar el gen y se ha analizado en detalle anteriormente o se conocen de otro modo por expertos en la materia. Los sitios de restricción adecuados pueden añadirse, si no están normalmente disponibles, a los extremos de la secuencia codificante para proporcionar un gen escindible para insertar en estos vectores. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente cualquier sistema de expresión/hospedador conocido en la técnica para su uso con las moléculas de ácido nucleico de la invención para producir una proteína recombinante deseada.

20

25

Como se ha analizado anteriormente, puede usarse cualquier sistema de expresión, incluyendo sistemas de levadura, bacterianos, animales, vegetales, eucariotas y procariotas. En algunas realizaciones, se prefiere cultivo de células de levadura, de mamífero y sistemas de producción de animales o plantas transgénicos. En otras realizaciones, pueden usarse sistemas de levadura que se han modificado para reducir la glucosilación, hiperglucosilación o actividad proteolítica de levadura nativa.

30

### **Aislamiento/purificación de proteínas de fusión de transferrina modificadas**

35 Pueden aislarse proteínas de fusión de transferrina modificada, biológicamente activas, secretadas del medio de células hospedadoras cultivadas en condiciones que permiten la secreción de las proteínas de fusión biológicamente activas. El material celular se retira del medio de cultivo, y las proteínas de fusión biológicamente activas se aíslan usando técnicas de aislamiento conocidas en este campo. Las técnicas de aislamiento adecuadas incluyen precipitación y fraccionamiento por diversos métodos cromatográficos, incluyendo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad.

40

Un método de purificación particularmente preferido es la cromatografía de afinidad en una columna quelante metálica o de unión a hierro o una cromatografía de inmunoafinidad usando un antígeno dirigido contra la transferrina o proteína terapéutica del polipéptido de fusión. El antígeno preferentemente se inmoviliza o se une a un soporte sólido o sustrato. Un sustrato particularmente preferido es Sepharose activada por CNBr (Pharmacia LKB Technologies, Inc., Piscataway, N. J.). Por este método, el medio se combina con el antígeno/sustrato en condiciones que permitan que se produzca la unión. El complejo puede lavarse para retirar el material no unido, y la proteína de fusión de transferrina se libera o se eluye mediante el uso de condiciones desfavorables para la formación de complejos. Los métodos de elución particularmente útiles incluyen cambios en el pH, en los que el antígeno inmovilizado tiene una alta afinidad para la proteína de fusión de transferrina a un primer pH y una afinidad reducida a un segundo (mayor o menor) pH; cambios en la concentración de ciertos agentes caotrópicos; o mediante el uso de detergentes.

45

50

### **Suministro de un fármaco o una proteína terapéutica al interior de una célula y/o a través de la barrera hematoencefálica (BBB)**

Las proteínas de fusión de transferrina modificadas pueden usarse como un vehículo para suministrar una molécula o molécula pequeña terapéutica en complejo con el ión férrico de transferrina al interior de una célula o a través de la barrera hematoencefálica u otras barreras incluyendo a través de la membrana celular de cualquier tipo celular que de forma natural o modificada técnicamente exprese un receptor de Tf. En estos ejemplos la proteína de fusión de Tf normalmente se generará técnicamente o se modificará para inhibir, evitar o retirar la glucosilación para extender la semivida en suero de la proteína de fusión y/o parte proteica terapéutica. La adición de un péptido de dirección se contempla específicamente para dirigir adicionalmente la proteína de fusión de Tf a un tipo celular particular, por ejemplo, una célula cancerosa.

55

60

65

El fármaco anti anémico, que contiene hierro, complejo de sorbitolcitrato férrico puede cargarse en una proteína de fusión de Tf modificada de la invención. Se ha mostrado que el sorbitol-citrato férrico (FSC) inhibe la proliferación de diversas células cancerosas murinas *in vitro* y provoca la regresión tumoral *in vivo*, aunque sin tener ningún efecto en la proliferación de células no malignas (Poljak-Blazi *et al.* (Junio de 2000) *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* (Estados Unidos), 15/3: 285-293).

El fármaco antineoplásico Adriamycin® (doxorubicina) y/o el fármaco quimioterapéutico bleomicina, ambos de los cuales se sabe que forman complejos con ión férrico, pueden cargarse en una proteína de fusión de Tf de la invención.

Puede prepararse una sal de un fármaco, por ejemplo, una sal de citrato o carbonato, y formar un complejo con el hierro férrico que se une después a Tf. Como las células tumorales con frecuencia presentan una mayor tasa de renovación para el hierro; la transferrina modificada para transportar al menos un agente antitumoral puede proporcionar un medio para aumentar la exposición al agente o cargar en las células tumorales. (Demant, E. J., (1983) *Eur. J. Biochem.* 137/(1-2): 113-118; Padbury *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 260/13: 7820-7823).

### Formulaciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

Las proteínas de fusión modificadas que comprenden una transferrina modificada de la invención pueden administrarse a un paciente que lo necesite usando protocolos de administración convencionales. Por ejemplo, las proteínas de fusión de Tf modificadas de la presente invención pueden proporcionarse solas, o en combinación, o en combinación secuencial con otros agentes que modulan un proceso patológico particular. Como se usa en el presente documento, se dice que dos agentes se administran en combinación cuando los dos agentes se administran simultáneamente o se administran independientemente de tal manera que los agentes actúen en el mismo o casi el mismo momento.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden administrarse mediante vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica y bucal. Por ejemplo, un agente puede administrarse por vía local en un sitio de lesión mediante microinfusión. Como alternativa, o simultáneamente, la administración puede ser no invasiva por la vía oral, de inhalación, nasal o pulmonar. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, si lo hubiera, frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado.

Aunque puede usarse cualquier método de administración para suministrar las proteínas de fusión de mTF de la invención, la administración o el suministro por vía oral puede ser una realización preferida para ciertas clases de proteínas de fusión o para tratar ciertas afecciones.

La presente invención proporciona además composiciones que contienen una o más proteínas de fusión de la invención. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos de cantidades eficaces de cada componente está dentro de la experiencia de la técnica. Las dosificaciones típicas comprenden de aproximadamente 1 pg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones preferidas para administración sistémica comprenden aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Las dosificaciones preferidas para administración directa a un sitio mediante microinfusión comprenden de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal. Cuando se administran mediante inyección directa o microinfusión, las proteínas de fusión modificadas de la invención pueden modificarse técnicamente para mostrar unión reducida o ausencia de unión del hierro para evitar, en parte, la toxicidad de hierro localizada.

Además de la proteína de fusión farmacológicamente activa, las composiciones de la presente invención pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y adyuvantes que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente para suministro al sitio de acción. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen ácidos grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, etiloleato o triglicéridos. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. También pueden usarse liposomas para encapsular el agente para suministro a la célula.

La formulación farmacéutica para administración sistémica de acuerdo con la invención puede formularse para administración entérica, parenteral o tópica. De hecho, los tres tipos de formulaciones pueden usarse simultáneamente para conseguir administración sistémica del principio activo. Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen cápsulas de gelatina duras o blandas, píldoras, comprimidos, incluyendo comprimidos recubiertos, elixires, suspensiones, jarabes o inhalaciones y formas de liberación controlada de los mismos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo como comprimidos o cápsulas. En dicha forma, la composición se subdivide en dosis unitaria que contiene cantidades apropiadas del principio activo; las formas de dosificación unitaria pueden ser composiciones envasadas, por ejemplo, polvos envasados, viales, ampollas, jeringas precargadas o sobrecitos que contienen líquidos. La forma de dosificación unitaria puede ser, por ejemplo, una cápsula o comprimido en sí mismo, o puede ser el número apropiado de cualquiera de dichas composiciones en forma de envase. La dosificación para usar en el tratamiento debe determinarse de forma subjetiva por el médico.

En la práctica de los métodos de la invención, las proteínas de fusión de la presente invención pueden usarse solas o en combinación, o en combinación con otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En ciertas realizaciones preferidas, los compuestos de la presente invención pueden coadministrarse junto con otros compuestos técnicamente prescritos para estas afecciones de acuerdo con la práctica médica generalmente aceptada. Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse *in vivo*, habitualmente en mamíferos, tales como seres humanos, ovejas, caballos, vacas, cerdos, perros, gatos, ratas y ratones, o *in vitro*.

### Composiciones farmacéuticas orales y métodos de suministro

En la presente invención, las proteínas de fusión de Tf modificadas pueden formularse para suministro oral. En particular, ciertas proteínas de fusión de la invención que se usan para tratar ciertas clases de enfermedades o afecciones médicas pueden ser particularmente susceptibles de formulación y suministro oral. Dichas clases de enfermedades o afecciones incluyen, pero sin limitación, enfermedades agudas, crónicas y recurrentes. Las enfermedades crónicas o recurrentes incluyen, pero sin limitación, enfermedad viral o infecciones, cáncer, enfermedades metabólicas, obesidad, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, alergia, enfermedad de injerto contra hospedador, infección microbiana sistémica, anemia, enfermedad cardiovascular, psicosis, enfermedades genéticas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos de células hematopoyéticas, enfermedades del sistema endocrino o del sistema reproductor, enfermedades gastrointestinales. Los ejemplos de estas clases de enfermedades incluyen diabetes, esclerosis múltiple, asma, infecciones por VHC o VIH, hipertensión, hipercolesterolemia, esclerosis arterial, artritis y enfermedad de Alzheimer. En muchas enfermedades crónicas, las formulaciones orales de proteínas de fusión de Tf de la invención y sus métodos de administración son particularmente útiles porque permiten el cuidado del paciente a largo plazo y la terapia mediante administración oral en casa sin necesitar protocolos farmacológicos o de tratamiento inyectable.

Las formulaciones y métodos de suministro orales que comprenden proteínas de fusión de Tf de la invención aprovechan, en parte, la transcitosis mediada por receptor de transferrina a través del epitelio gastrointestinal (GI). El receptor de Tf se encuentra en una muy alta densidad en el epitelio GI humano, la transferrina es altamente resistente a digestión triptica y quimiotriptica y se han usado conjugados químicos de Tf para suministrar con éxito proteínas y péptidos a través del epitelio GI (Xia *et al.*, (2000) *J. Pharmacol. Experiment. Therap.*, 295: 594-600; Xia *et al.* (2001) *Pharmaceutical Res.*, 18(2): 191-195; y Shah *et al.* (1996) *J. Pharmaceutical Sci.*, 85(12): 1306-1311).

Una vez que se han transportado a través del epitelio GI, las proteínas de fusión de Tf de la invención muestran semivida en suero prolongada, es decir, la proteína o el péptido o péptidos terapéuticos unidos o insertados en Tf muestran una semivida en suero prolongada en comparación con la proteína o el péptido en su estado no fusionado.

Pueden prepararse formulaciones orales de proteínas de fusión de Tf de la invención de modo que sean adecuadas para el transporte al epitelio GI y protección del componente de proteína de fusión de Tf y otros componentes activos en el estómago. Dichas formulaciones pueden incluir componentes vehículos y dispersantes y pueden estar en cualquier forma adecuada, incluyendo aerosoles (para suministro oral o pulmonar), jarabes, elixires, comprimidos, incluyendo comprimidos masticables, cápsulas duras y blandas, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones, sobrecitos o granulados en microgránulos, y polvos dispersables. Preferentemente, las formulaciones de proteínas de fusión de Tf se emplean en formas de dosificación sólida adecuadas para administración sencilla, y preferentemente oral, de dosificaciones precisas. Las formas de dosificación sólida para administración oral son preferentemente comprimidos, cápsulas o similares.

Para administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, debería tenerse cuidado para asegurar que la composición permita que se absorba suficiente principio activo por el hospedador para producir una respuesta eficaz. Por lo tanto, por ejemplo, la cantidad de proteína de fusión de Tf puede aumentarse sobre la teóricamente requerida o pueden tomarse otras medidas conocidas tales como recubrimiento o encapsulación para proteger los polipéptidos de la acción enzimática en el estómago.

Tradicionalmente, se han administrado fármacos peptídicos y proteicos mediante inyección debido a la escasa biodisponibilidad cuando se administran por vía no parenteral, y en particular por vía oral. Estos fármacos son propensos a la inestabilidad química y conformacional y se degradan con frecuencia por las condiciones ácidas del estómago, así como por enzimas del estómago y el tracto gastrointestinal. En respuesta a estos problemas de suministro, se han desarrollado ciertas tecnologías para el suministro oral, tales como encapsulación en nanopartículas compuestas de polímeros con una cadena principal hidrófoba y ramas hidrófilas como vehículos

farmacológicos, encapsulación en micropartículas, inserción en liposomas en emulsiones y conjugación con otras moléculas. Todos estos pueden usarse con las moléculas de fusión de Tf de la presente invención.

Los ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas mucoadhesivas recubiertas con quitosano y Carbopol (Takeuchi *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 47(1): 39-54, 2001) y nanopartículas que contienen poliésteres de combinación cargados, poli(2-sulfobutil-vinil alcohol) y poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (Jung *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50(1): 147-160, 2000). Las nanopartículas que contenían polímeros de superficie con regiones de poli-N-isopropilacrilamida y grupos de polivinilamina catiónica mostraron absorción mejorada de calcitonina de salmón cuando se administraron por vía oral a ratas.

Las partículas de suministro de fármacos compuestas de alginato y pectina, potenciadas con polilisina, son relativamente resistentes a ácidos y bases y pueden usarse como vehículos para fármacos. Estas partículas combinan las ventajas de la bioadhesión, absorción potenciada y liberación sostenida (Liu *et al.*, J. Pharm. Pharmacol. 51(2): 141-149, 1999).

Adicionalmente, se ha mostrado que grupos de lipoaminoácidos y grupos de liposacáridos conjugados con los extremos N y C terminales de péptidos tales como somatostatina sintética, que crea un tensioactivo anfipático, producen una composición que conservaban la actividad biológica (Toth *et al.*, J. Med. Chem. 42(19): 4010-4013, 1999).

Los ejemplos de otras tecnologías de suministro de péptidos incluyen emulsiones mucoadhesivas recubiertas con carbopol que contienen el péptido de interés y nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina y carbopol o taurocolato y carbopol. Se ha mostrado que estos son eficaces cuando se administran por vía oral a ratas para reducir las concentraciones de calcio en suero (Ogiso *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 24(6): 656-661, 2001). Se ha usado fosfatidiletanol, derivado de fosfatidilcolina, para preparar liposomas que contienen fosfatidiletanol como un vehículo de insulina. Se ha mostrado que estos liposomas, cuando se administran por vía oral a ratas, están activos (Kisel *et al.*, Int. J. Pharm. 216(1-2): 105-114, 2001).

La insulina también se ha formulado en esferas de gel-poli(vinil alcohol) que contienen insulina y un inhibidor de proteasa, tal como aprotinina o bacitracina. Las propiedades reductoras de glucosa de estas esferas de gel se han demostrado en ratas, en las que la insulina se libera en gran medida en el intestino inferior (Kimura *et al.*, Biol. Pharm. Bull. 19(6): 897-900, 1996).

También se ha estudiado el suministro oral de insulina usando nanopartículas compuestas de poli(alquil cianoacrilato) que se dispersaron con un tensioactivo en una fase oleosa (Dange *et al.*, J. Pharm. Sci. 86(12): 1403-1409, 1997) y usando perlas de alginato cálcico recubiertas con quitosano (Onal *et al.*, Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 30(3): 229-237, 2002).

En otros métodos, los extremos N y C terminales de un péptido se unen con polietilenglicol y después con cadenas de alilo para formar conjugados con resistencia mejorada a degradación enzimática y difusión mejorada a través de la pared GI ([www.nobexcorp.com](http://www.nobexcorp.com)).

BioPORTER® es una mezcla de lípidos catiónicos, que interacciona de forma no covalente con péptidos para crear un recubrimiento o una capa protector. El complejo de péptido-lípido puede fusionarse con membranas plasmáticas de células, y los péptidos se internalizan en las células ([www.genetherapysystems.com](http://www.genetherapysystems.com)).

En un proceso que usa liposomas como material de partida, se han desarrollado partículas en forma coclear como un vehículo farmacéutico. Se añade un péptido a una suspensión de liposomas que contienen principalmente lípidos con carga negativa. La adición de calcio provoca el colapso y la fusión de los liposomas en grandes láminas compuestas de bicapas lipídicas, que después se enrollan o se apilan espontáneamente en espirales (Patente de Estados Unidos 5.840.707; <http://www.biodeliverysciences.com>).

Pueden prepararse composiciones que comprenden proteína de fusión de Tf pretendida para uso oral de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes para proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y apetitosa. Por ejemplo, para preparar comprimidos suminizables por vía oral, la proteína de fusión de Tf se mezcla con al menos un excipiente farmacéutico, y la formulación sólida se comprime para formar un comprimido de acuerdo con métodos conocidos, para suministro al tracto gastrointestinal. La composición de comprimido se formula normalmente con aditivos, por ejemplo un vehículo de sacárido o celulosa, un aglutinante tal como pasta de almidón o metilcelulosa, una carga, un disgregante u otros aditivos normalmente usados habitualmente en la fabricación de preparaciones médicas. Para preparar cápsulas suminizables por vía oral, DHEA se mezcla con al menos un excipiente farmacéutico, y la formulación sólida se coloca en un recipiente capsular adecuado para suministro al tracto gastrointestinal. Pueden prepararse composiciones que comprenden la proteína de fusión de Tf como se describe en general en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042) en el Capítulo 89.

- Como se ha descrito anteriormente, muchas de las formulaciones orales de la invención pueden contener ingredientes inertes que permiten la protección contra el ambiente estomacal, y liberación del material biológicamente activo en el intestino. Dichas formulaciones, o recubrimientos entéricos, se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse comprimidos que contienen proteína de fusión de Tf en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina o goma arábiga y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.
- 5
- 10 Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden estar recubiertos con técnicas conocidas para retardar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y de este modo proporcionar una acción sostenida a lo largo de un periodo de tiempo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como gliceril monoestearato o gliceril diestearato solo o con una cera.
- 15 Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo está mezclado con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo está mezclado con un medio acuoso o uno oleoso, por ejemplo, aceite de *arachis*, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.
- 20 Las suspensiones acuosas pueden contener proteína de fusión de Tf en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes de dispersión o humectantes pueden ser una fosfatida de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadeciletiloxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como polioxietilén sorbitol monooleato o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo polioxietilén sorbitán monooleato. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, etil o n-propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saporíferos y uno o más agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina.
- 25
- 30
- Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes, tales como los expuestos anteriormente, y agentes saporíferos para proporcionar una preparación oral apetitosa. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.
- 35
- 40 Polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo y mezcla con agentes de dispersión o humectante, agentes de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados se ejemplifican por los ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, saporíferos y colorantes.
- 45
- Las composiciones farmacéuticas que contienen proteína de fusión de Tf también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, goma arábiga o goma de tragacanto, fosfatidas de origen natural, por ejemplo lecitina de soja y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, sorbitán monooleato y productos de condensación de los mismos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, polioxietilén sorbitán monooleato. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saporíferos.
- 50
- Pueden formularse jarabes y elixires que contienen la proteína de fusión de Tf con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante y agentes saporíferos y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginoso inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. Las preparaciones inyectables estériles también pueden ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvato parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1, 3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro sódico isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles, como un disolvente o medio de suspensión. Durante este periodo puede emplearse cualquier aceite fijo insípido que incluya mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.
- 55
- 60
- 65

Las composiciones farmacéuticas también pueden formularse para suministro oral usando microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas de proteinoide, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, Oral Delivery of Microencapsulated Proteins, en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)).

5 La proporción de proteína de fusión de Tf farmacéuticamente activa frente a vehículo y/u otras sustancias pueden variar de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 100 % p (porcentaje en peso). Para su uso oral, la formulación farmacéutica contendrá generalmente de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 100 % en peso del material activo. Para otros usos, la formulación tendrá en general de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 50 % p del material activo.

Las formulaciones de proteínas de fusión Tf empleadas en la invención proporcionan una cantidad eficaz de proteína de fusión de Tf tras la administración a un individuo. Como se usa en este contexto, una "cantidad eficaz" de fusión de Tf es una cantidad que es eficaz para aliviar un síntoma de una enfermedad.

15 La composición de proteína de fusión de Tf de la presente invención puede administrarse, aunque no es necesario, diariamente, en una cantidad eficaz para aliviar un síntoma. En general, la dosificación diaria total será de al menos aproximadamente 50 mg, preferentemente al menos aproximadamente 100 mg y más preferentemente al menos aproximadamente 200 mg, y preferentemente no más de 500 mg al día, administrada por vía oral, por ejemplo, en 4 20 cápsulas o comprimidos, conteniendo cada uno 50 mg de proteína de fusión de Tf. Las cápsulas o comprimidos para suministro oral pueden contener convenientemente hasta una dosis oral diaria completa, por ejemplo, 200 mg o más.

Las composiciones farmacéuticas orales que comprenden proteína de fusión Tf pueden formularse en forma líquida 25 tamponada que se encapsula después en cápsulas de gelatina con cubierta dura o blanda que después se recubren con un recubrimiento entérico apropiado. Para las composiciones farmacéuticas orales de la invención, la localización de liberación puede ser cualquiera en el sistema GI, incluyendo el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso.

30 Pueden formularse composiciones orales de la invención para liberar lentamente los principios activos, incluyendo las proteínas de fusión de Tf de la invención, en el sistema GI usando formulaciones de hibridación retardada conocidas.

Las proteínas de fusión de Tf de la invención para suministro oral son capaces de unirse con el receptor de Tf 35 hallado en el epitelio GI. Para facilitar esta unión y el transporte mediado por receptor, las proteínas de fusión de Tf de la invención se producen normalmente con hierro y en algunos casos carbonato, unido con el resto de Tf. Se conocen en la técnica procesos y métodos para cargar el resto de Tf de las composiciones de proteína de fusión de la invención con hierro y carbonato.

40 En algunas formulaciones farmacéuticas de la invención, el resto de Tf de la proteína de fusión de Tf puede modificarse para aumentar la afinidad o avidéz del resto de Tf por el hierro. Dichos métodos se conocen en la técnica. Por ejemplo, puede usarse mutagénesis para producir restos de transferrina mutantes que se unen con el hierro con más avidéz que la transferrina natural. En transferrina de suero humano, los aminoácidos que son 45 ligandos de quelación de iones metálicos incluyen, pero sin limitación aminoácidos del lóbulo N Asp63, Tyr 95, Tyr188, Lys206, His207 y His249; y aminoácidos del lóbulo C Asp392, Tyr426, Tyr517 y His585 de SEC ID N°: 3 (el número junto al aminoácido indica la posición del resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos primaria en la que la valina de la proteína madura se designa posición 1). Véase Patente de Estados Unidos 5.986.067.

50 En una realización, los restos de Lys206 y His207 dentro del lóbulo N se reemplazan con Gln y Glu, respectivamente.

En algunas formulaciones farmacéuticas de la invención, la proteína de fusión de Tf se modifica técnicamente para 55 contener un sitio de escisión entre la proteína o el péptido terapéutico y el resto de Tf. Dichos sitios de escisión o enlazadores se conocen en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención y los métodos de tratamiento pueden incluir la adición de un 60 potenciador de transcitososis para facilitar la transferencia de la proteína de fusión a través del epitelio GI. Dichos potenciadores se conocen en la técnica. Véase Xia *et al.*, (2000) J. Pharmacol. Experiment. Therap., 295: 594-600; y Xia *et al.* (2001) Pharmaceutical Res., 18(2): 191-195.

65 En realizaciones preferidas de la invención, las formulaciones farmacéuticas orales incluyen proteínas de fusión de Tf que comprenden un resto de Tf modificado que muestra glucosilación reducida o no muestra glucosilación fusionada en el extremo N terminal con una insulina o proteína o péptido de GLP-1 como se ha descrito anteriormente. Dichas composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratar trastornos de desequilibrio de la glucosa tales como diabetes por administración oral de la composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz de la proteína de fusión.

La dosis eficaz de proteína de fusión puede medirse de varias maneras, incluyendo dosificaciones calculadas para aliviar síntomas asociados con una patología específica en un paciente, tales como los síntomas de diabetes. En otras formulaciones, las dosificaciones se calculan para comprender una cantidad eficaz de proteína de fusión para inducir un cambio detectable en los niveles de glucosa en sangre en el paciente. Dichos cambios detectables en glucosa en sangre pueden incluir una reducción de los niveles de glucosa en sangre de entre aproximadamente el 1 % y el 90 %, o entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 80 %. Estas reducciones en los niveles de glucosa en sangre dependerán de la condición de enfermedad que se trate y pueden modificarse composiciones farmacéuticas o métodos de administración para conseguir el resultado deseado para cada paciente. En otros casos, las composiciones farmacéuticas se formulan y los métodos de administración se modifican para detectar un aumento en el nivel de actividad de la proteína o el péptido terapéutico en el paciente, por ejemplo, aumentos detectables en las actividades de la insulina o GLP-1. Dichas formulaciones y métodos pueden suministrar entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de la proteína de fusión, entre aproximadamente 100 ng y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal de la proteína de fusión, entre aproximadamente 100 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de la proteína de fusión, entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 1 g de proteína de fusión, entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 100 mg de proteína de fusión o entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 50 mg de proteína de fusión. Las formulaciones también pueden calcularse usando una medición de unidad de la actividad de la proteína terapéutica, tal como de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 unidades de insulina humana o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 unidades de insulina humana. Las mediciones en peso o actividad pueden calcularse usando patrones conocidos para cada proteína o péptido terapéutico fusionado con Tf.

También se describen en el presente documento métodos para administrar por vía oral las composiciones farmacéuticas de la invención. Dichos métodos pueden incluir, pero sin limitación, etapas para administrar por vía oral las composiciones por el paciente o un cuidador. Dichas etapas de administración pueden incluir administración a intervalos tales como una vez o dos veces al día dependiendo de la proteína de fusión de Tf, la enfermedad o la condición del paciente o el paciente individual. Dichos métodos también incluyen la administración de diversas dosificaciones de la proteína de fusión de Tf individual. Por ejemplo, la dosificación inicial de una composición farmacéutica puede ser a un mayor nivel para inducir un efecto deseado, tal como reducción en los niveles de glucosa en sangre. Las dosificaciones posteriores pueden reducirse después una vez que se ha conseguido un efecto deseado. Estos cambios o modificaciones a los protocolos de administración pueden realizarse por el médico a cargo o trabajador de cuidados sanitarios. En algunos casos, los cambios en el protocolo de administración pueden realizarse por el paciente individual, tales como cuando un paciente controla los niveles de glucosa en sangre y administra una composición oral de mTf GLP-1 o de insulina mTf de la invención.

También se describen métodos para producir composiciones orales o composiciones médicas de la invención que comprenden formular una proteína de fusión de Tf de la invención en una forma administrable por vía oral. En otros casos, se describen métodos para producir composiciones o composiciones médicas de la invención que comprenden formular una proteína de fusión de Tf de la invención en una forma adecuada para administración oral.

Además, se describe en el presente documento un suministro pulmonar de las formulaciones de proteínas de fusión de Tf. El suministro pulmonar es particularmente prometedor para el suministro de macromoléculas que son difíciles de suministrar por otras vías de administración. Dicho suministro pulmonar puede ser eficaz tanto para suministro sistémico como para suministro localizado para tratar enfermedades de los pulmones, ya que los fármacos suministrados al pulmón se absorben fácilmente a través de la región alveolar directamente a la circulación sanguínea.

La presente invención proporciona composiciones adecuadas para formar una dispersión farmacológica para inhalación oral (suministro pulmonar) para tratar diversas afecciones o enfermedades. La formulación de proteína de fusión de Tf podría suministrarse por diferentes enfoques tales como nebulizadores líquidos, inhaladores de dosis medida basados en aerosol (MDI), y dispositivos de dispersión de polvo seco. En la formulación de composiciones para suministro pulmonar, se añaden habitualmente vehículos farmacéuticamente aceptables incluyendo agentes activos en superficie o tensioactivos y portadores de carga para proporcionar características de estabilidad, capacidad de dispersión, uniformidad y/o masificación para potenciar el suministro pulmonar uniforme de la composición al sujeto.

Los agentes activos en superficie o tensioactivos promueven la absorción del polipéptido a través de la membrana o el revestimiento de la mucosa. Los agentes activos en superficie o tensioactivos útiles incluyen ácidos grasos y sales de los mismos, sales biliares, fosfolípidos o un alquil sacárido. Los ejemplos de ácidos grasos y sales de los mismos incluyen sales de sodio, potasio y lisina de caprilato (C<sub>8</sub>), caprato (C<sub>10</sub>), laurato (C<sub>12</sub>) y miristato (C<sub>14</sub>). Los ejemplos de sales biliares incluyen ácido cólico, ácido quenodisoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicoquenodesoxicólico, ácido tauroquenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurodesoxicólico, ácido litocólico y ácido ursodesoxicólico.

Los ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfolípidos monocatenarios, tales como lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilinositol y lisofosfatidilserina; o fosfolípidos bicatenarios, tales como diacilfosfatidilcolinas, diacilfosfatidilgliceroles, diacilfosfatidiletanolaminas, diacilfosfatidilinositoles y

diacilfosfatidilserinas. Los ejemplos de alquil sacáridos incluyen alquil glucósidos o alquil maltósidos, tales como decil glucósido y dodecil maltósido.

5 Los excipientes farmacéuticos que son útiles como vehículos incluyen estabilizadores tales como albúmina de suero humano (HSA); agentes de masificación tales como carbohidratos, aminoácidos y polipéptidos; agentes de ajuste del pH o tampones; sales tales como cloruro sódico; y similares. Estos vehículos pueden estar en una forma cristalina o amorfa o pueden ser una mezcla de las dos.

10 Los ejemplos de carbohidratos para su uso como agentes de masificación incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como lactosa, trehalosa y similares; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos y similares; alditoles, tales como manitol, xilitol y similares. Los ejemplos de polipéptidos para su uso como agentes de masificación incluyen aspartamo. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, prefiriéndose glicina.

15 Pueden incluirse aditivos, que son componentes menores de la composición, para estabilidad conformacional durante el secado por pulverización y para mejorar la capacidad de dispersión del polvo. Estos aditivos incluyen aminoácidos hidrófobos tales como triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina y similares.

20 Los agentes de ajuste del pH o tampones adecuados incluyen sales orgánicas preparadas a partir de ácidos y bases orgánicas, tales como citrato sódico, ascorbato sódico y similares; se prefiere el citrato sódico.

25 Las composiciones de fusión de Tf para suministro pulmonar pueden envasarse como dosis unitarias en las que está presente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición en un receptáculo de dosis unitaria, tal como un envase de blíster, cápsula de gelatina o similares. La fabricación de envases de blíster o cápsulas de gelatinas se lleva a cabo normalmente por métodos que se conocen bien en general en la técnica del envasado.

30 La Patente de Estados Unidos 6.524.557 desvela una formulación de aerosol farmacéutica que comprende (a) un propulsor de HFA; (b) un polipéptido farmacéuticamente activo dispersable en el propulsor; y (c) un tensioactivo que es un ácido graso C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub> o sal del mismo, una sal biliar, un fosfolípidos o un alquil sacárido, potenciando dicho tensioactivo la absorción sistémica del polipéptido en el tracto respiratorio inferior. La solicitud también describe métodos para fabricar dichas formulaciones y el uso de dichas formulaciones en el tratamiento de pacientes.

35 Un enfoque para el suministro pulmonar de fármacos en polvo seco utiliza un dispositivo portátil con una bomba manual para proporcionar una fuente de gas presurizado. El gas presurizado se libera de forma abrupta a través de un dispositivo de dispersión de polvo, tal como una boquilla venturi, y el polvo dispersado se pone a disposición para inhalación por el paciente.

40 Se describen dispositivos de polvo seco en varias patentes. La Patente de Estados Unidos N° 3.921.637 describe una bomba manual con agujas para perforar a través de una única cápsula de medicina en polvo. El uso de múltiples discos de receptáculos o tiras de medicamento se describe en la solicitud de Patente Europea N° EP 0 467 172; Publicaciones de Patente Internacional N° WO 91/02558; y documento WO 93/09832; Patentes de Estados Unidos N° 4.627.432; 4.811.731; 5.035.237; 5.048.514; 4.446.862; 5.048.514 y 4.446.862.

45 La aerosolización de agentes terapéuticos proteicos se desvela en la Solicitud de Patente Europea N° EP 0 289 336. Se desvelan formulaciones de aerosol terapéuticas en la Publicación de Patente Internacional N° WO 90/09781.

50 La presente invención proporciona una proteína de fusión de Tf formulada para inhalación oral. La formulación comprende proteína de fusión de Tf y excipientes farmacéuticos adecuados para suministro pulmonar. También se describe la administración de la composición de proteína de fusión de Tf mediante inhalación oral a sujetos que lo necesiten.

### **Animales transgénicos**

55 La producción de animales no humanos transgénicos que contienen una construcción de fusión de transferrina modificada con semivida en suero aumentada, estabilidad en suero aumentada o biodisponibilidad aumentada de la presente invención se contempla en una realización de la presente invención. En algunos ejemplos, puede usarse lactoferrina como la parte de Tf de la proteína de fusión de modo que se produzca la proteína de fusión y se secrete en leche.

60 La producción exitosa de animales no humanos, transgénicos, se ha descrito en varias patentes y publicaciones, tales como, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 6.291.740 (expedida el 18 de septiembre de 2001); Patente de Estados Unidos 6.281.408 (expedida el 28 de agosto de 2001); y Patente de Estados Unidos 6.271.436 (expedida el 7 de agosto de 2001).

65 La capacidad para alterar la composición genética de los animales, tales como mamíferos domesticados incluyendo vacas, cerdos, cabras, caballos y ovejas, permite varias aplicaciones comerciales. Estas aplicaciones incluyen la

producción de animales que expresan grandes cantidades de proteínas exógenas en una forma de recogida fácil (por ejemplo, expresión en la leche o sangre), la producción de animales con mayor aumento de peso, eficacia alimentaria, composición del cadáver, producción o contenido de leche, resistencia a la enfermedad y resistencia a infección por microorganismos específicos y la producción de animales que tienen tasas de crecimiento o rendimiento reproductor potenciados. Los animales que contienen secuencias de ADN exógeno en su genoma se denominan animales transgénicos.

El método más ampliamente usado para la producción de animales transgénicos es la microinyección de ADN en los pronúcleos de embriones fertilizados (Wall *et al.*, J. Cell. Biochem. 49: 113 [1992]). Otros métodos para la producción de animales transgénicos incluyen la infección de embriones con retrovirus o con vectores retrovirales. Se ha presentado la infección de embriones de ratón tanto pre como postimplantación con retrovirus de tipo silvestre o recombinantes (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260 [1976]; Janenich *et al.*, Cell 24: 519 [1981]; Stuhlmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7151 [1984]; Jahner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6927 [1985]; Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152 [1985]; Stewart *et al.*, EMBO J. 6: 383-388 [1987]).

Un medio alternativo para infectar embriones con retrovirus es la inyección de virus o células productoras de virus en el blastocelo de embriones de ratón (Jahner, D. *et al.*, Nature 298: 623 [1982]). Se ha presentado la introducción de transgenes en la línea germinal de ratones usando infección retroviral intrauterina del embrión de ratón a media gestación (Jahner *et al.*, mencionado anteriormente [1982]). Se ha presentado la infección de embriones bovinos y ovinos con retrovirus o vectores retrovirales para crear animales transgénicos. Estos protocolos implican la microinyección de partículas retrovirales o células con crecimiento detenido (es decir, tratadas con mitomicina C) que desprenden partículas retrovirales al espacio perivitelino de óvulos fertilizados o embriones tempranos (Solicitud Internacional de PCT WO 90/08832 [1990]; y Haskell y Bowen, Mol. Reprod. Dev., 40: 386 [1995]. La Solicitud Internacional de PCT WO 90/08832 describe la inyección de virus de leucemia felina de tipo silvestre B en el espacio perivitelino de embriones de oveja en el estadio de 2 a 8 células. Se ha mostrado que los fetos derivados de embriones inyectados contienen múltiples sitios de integración.

La Patente de Estados Unidos 6.291.740 (expedida el 18 de septiembre de 2001) describe la producción de animales transgénicos por la introducción de ADN exógeno en oocitos premaduración y oocitos no fertilizados, maduros (es decir, oocitos prefertilización) usando vectores retrovirales que transducen las células en división (por ejemplo, vectores derivados del virus de leucemia murina [MLV]). Esta patente también describe métodos y composiciones para expresión conducida por promotor de citomegalovirus, así como LTR de tumor mamario de ratón de diversas proteínas recombinantes.

La Patente de Estados Unidos 6.281.408 (expedida el 28 de agosto de 2001) describe métodos para producir animales transgénicos usando células madre embrionarias. Brevemente, las células madre embrionarias se usan en un cocultivo celular mixto con una mórula para generar animales transgénicos. Se introduce material genético ajeno en las células madre embrionarias antes de cocultivar, por ejemplo, por electroporación, microinyección o suministro retroviral. Las células ES transfectadas de esta manera se seleccionan para integraciones del gen mediante un marcador de selección tal como neomicina.

La Patente de Estados Unidos 6.271.436 (expedida el 7 de agosto de 2001) describe la producción de animales transgénicos usando métodos que incluyen aislamiento de células germinales primordiales, cultivar estas células para producir líneas celulares derivadas de células germinales primordiales, transformar tanto las células germinales primordiales como las líneas celulares cultivadas, y usar estas células y líneas celulares transformadas para generar animales transgénicos. La eficacia con la que se generan animales transgénicos aumenta en gran medida, permitiendo de este modo el uso de recombinación homóloga en la producción de especies animales no roedoras transgénicas.

### Terapia génica

Se contempla el uso de construcciones de fusión de transferrina modificadas para terapia génica en las que una proteína de transferrina o dominio de transferrina se une a una proteína o un péptido terapéutico. Las construcciones de fusión de transferrina modificadas con semivida en suero o estabilidad en suero aumentada de la presente invención se ajustan idealmente a tratamientos de terapia génica.

Se ha descrito el uso exitoso de terapia génica para expresar una proteína de fusión soluble. Brevemente, se ha mostrado recientemente la terapia génica mediante inyección de un vector adenoviral que contiene un gen que codifica una proteína de fusión soluble que consiste en el antígeno de linfocitos citotóxicos 4 (CTLA4) y la parte Fc de inmunoglobulina humana G1 en Ijima *et al.* (10 de junio de 2001) Human Gene Therapy (Estados Unidos) 12/9: 1063-77. En esta aplicación de la terapia génica, un modelo murino de artritis inducida por colágeno de tipo II se trató con éxito mediante inyección intraarticular del vector.

La terapia génica también se describe en varias patentes de Estados Unidos incluyendo Patente de Estados Unidos 6.225.290 (expedida el 1 de mayo de 2001); Patente de Estados Unidos 6.187.305 (expedida el 13 de febrero de 2001); y Patente de Estados Unidos 6.140.111 (expedida el 31 de octubre de 2000).

5 La Patente de Estados Unidos 6.225.290 proporciona métodos y construcciones por las que las células epiteliales intestinales de un sujeto mamífero se alteran genéticamente para incorporar operativamente un gen que expresa una proteína que tiene un efecto terapéutico deseado. Se consigue transformación de células intestinales mediante administración de una formulación compuesta principalmente de ADN desnudo y el ADN puede administrarse por vía oral. Las vías orales u otras gastrointestinales de administración proporcionan un método sencillo de administración, mientras que el uso de ácidos nucleicos desnudos evita las complicaciones asociadas con el uso de vectores virales para conseguir la terapia génica. La proteína expresada se secreta directamente al tracto gastrointestinal y/o al torrente sanguíneo para obtener niveles en sangre terapéuticos de la proteína tratando de este modo al paciente que necesite la proteína. Las células epiteliales intestinales transformadas proporcionan curas terapéuticas a corto o largo plazo para enfermedades asociadas con una deficiencia de una proteína particular o que son susceptibles de tratamiento por sobreexpresión de una proteína.

La Patente de Estados Unidos 6.187.305 proporciona métodos de dirección génica o de ADN en células de origen vertebrado, particularmente mamífero. Brevemente, se introduce ADN en células primarias o secundarias de origen vertebrado mediante recombinación homóloga o dirección del ADN, que se introduce en ADN genómico de las células primarias o secundarias en un sitio preseleccionado.

La Patente de Estados Unidos 6.140.111 (expedida el 31 de octubre de 2000) describe vectores de terapia génica retrovirales. Los vectores retrovirales desvelados incluyen un sitio de inserción para genes de interés y son capaces de expresar altos niveles de la proteína derivada de los genes de interés en una amplia diversidad de tipos celulares transfectados. También se desvelan vectores retrovirales que carecen de un marcador seleccionable, haciéndolos de este modo adecuados para terapia génica humana en el tratamiento de diversas patologías sin la coexpresión de un producto marcador, tal como un antibiótico. Estos vectores retrovirales son especialmente adecuados para su uso en ciertas líneas celulares de empaquetamiento. La capacidad de los vectores retrovirales para insertarse en el genoma de células de mamífero los ha hecho candidatos particularmente prometedores para su uso en la terapia génica de enfermedades genéticas en seres humanos y animales. La terapia génica implica normalmente (1) añadir nuevo material genético a células de pacientes *in vivo* o (2) retirar células de pacientes del cuerpo, añadir nuevo material genético a las células y reintroducirlas en el cuerpo, es decir, terapia génica *in vitro*. Pueden encontrarse análisis de cómo realizar terapia génica en diversas células usando vectores retrovirales, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.868.116, expedida el 19 de septiembre de 1989 y 4.980.286, expedida el 25 de diciembre de 1990 (células epiteliales), documento WO 89/07136 publicado el 10 de agosto de 1989 (células hepatocíticas), documento EP 378.576 publicado el 25 de julio de 1990 (células fibroblásticas) y documento WO 89/05345 publicado el 15 de junio de 1989 y documento WO/90/06997, publicado el 28 de junio de 1990 (células endoteliales).

#### **Kits que contienen proteínas de fusión de transferrina**

40 También se describen en el presente documento kits que contienen proteínas de fusión de transferrina, que pueden usarse, por ejemplo, para las aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas. El kit comprende un recipiente con un marcador. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que incluye una proteína de fusión de transferrina que es eficaz para aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas, tales como las descritas anteriormente. El agente activo en la composición es la proteína terapéutica. La etiqueta en el recipiente indica que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y también puede indicar instrucciones para su uso *in vivo* o *in vitro*, tal como los descritos anteriormente.

50 El kit comprenderá normalmente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes adicionales que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, jeringas, agujas y prospectos con instrucciones para su uso.

55 Sin una descripción adicional, se cree que un experto habitual en la materia puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, preparar y utilizar la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Por ejemplo, un experto en la materia sería capaz de determinar fácilmente la actividad biológica, tanto *in vitro* como *in vivo*, para las construcciones de proteínas de fusión de la presente invención en comparación con la actividad comparable del resto terapéutico en su estado no fusionado. De forma similar, un experto en la materia podría determinar fácilmente la semividua en suero y estabilidad en suero de construcciones de acuerdo con la presente invención. Los siguientes ejemplos de trabajo apuntan, por lo tanto, específicamente a las realizaciones preferidas de la presente invención, y no debe interpretarse como limitantes de ningún modo del resto de la divulgación.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: proteína de fusión de T-20/transferrina**

5 T-20 es un péptido inhibidor fusogénico de VIH con la siguiente secuencia de aminoácidos: YTSLIHSLEESQN-  
 QQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEC ID N°: 17). La presente divulgación proporciona proteínas de fusión que  
 comprenden el péptido T-20 y transferrina modificada (mTf) con semivida aumentada y composiciones  
 farmacéuticas de dichas proteínas de fusión para el tratamiento de enfermedades asociadas con la transmisión de  
 10 un virus. El ejemplo descrito posteriormente también puede usarse para generar proteínas de fusión de transferrina  
 con análogos de los péptidos de T-20.

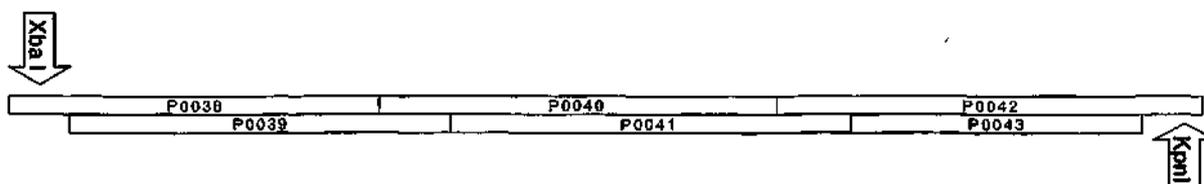
La proteína de fusión de transferrina con actividad anti VIH se produjo fusionando T-20 con transferrina modificada  
 (mTf) usando *Saccharomyces cerevisiae*. En consecuencia, en la primera etapa, SEC ID N°: 17 se tradujo de vuelta  
 15 a codón de ADN optimizado para *Saccharomyces cerevisiae* y se usó para producir construcciones de fusión de T-  
 20 en el extremo N o C terminal de mTf.

**Fusión 5'**

20 Como ejemplo, T-20 se fusiona con el extremo 5' de mTf usando cebadores solapantes con salientes de sitios de  
 restricción en cada extremo, tales como sitios *XbaI* y *KpnI* para ligamiento en un vector apropiado. Como alternativa,  
 podrían generarse cebadores solapantes con otros salientes de sitios de restricción o los cebadores podrían  
 hibridarse con adaptadores con salientes de sitios de restricción apropiados para ligamiento en un vector diseñado  
 específicamente.

25 Un vector se diseña específicamente con sitios de restricción tales como sitios *XbaI* y *KpnI* para permitir la fusión de  
 moléculas terapéuticas en el extremo N terminal de mTf. Los cebadores se hibridan y clonan en este vector usando  
 los sitios *XbaI* y *KpnI* u otros sitios de restricción apropiados en el extremo 5' del vector de transferrina modificada  
 (mTf). El casete que codifica la proteína de fusión de T-20/mTf se retira después del vector y se clona en un vector  
 de levadura para expresión proteica.

30 Específicamente, los siguientes cebadores solapantes con salientes de restricción se diseñan para producir la fusión  
 de T-20 5':



35 Los cebadores solapantes tienen las siguientes secuencias:

P0038:

CTAGAGAAAAGGTACACTAGCTTAATACAC (SEC ID N°: 18)

40

P0039:

TGCGATTCTTCAATTAAGGAGTGATTAAGCTAGTGACCTTTTCT (SEC ID N°: 19)

45

P0040:

TCCTTAATTGAAGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATG (SEC ID N°: 20)

50

P0041:

TAATCCAATAATTCTTGTTTCATTCTTTCTTGCTGGTTT (SEC ID N°: 21)

P0042:

AACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTG  
 TAC  
 (SEC ID N°: 22)

55

P0043:

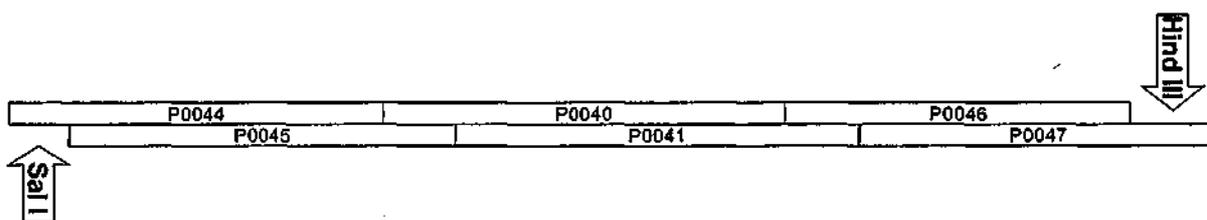
AAACCAATTCCACAAACTTGCCCATTTATC (SEC ID N°: 23)

5 Los cebadores se hibridan a 65 °C y se ligan en el vector específicamente diseñado pREX0004, cortado con *Xba*I y *Kpn*I para crear pREX0016. Después de la identificación de un clon correcto por secuenciación, el clon correcto se aumenta de masa y se digiere con otro par de enzimas de restricción apropiadas tales como *Pst*I y *Age*I para retirar el casete que codifica la proteína de fusión de T-20/mTf de pREX0016. El casete se liga en un vector de levadura, tal como pSAC3, cortado con *Pst*I y *Age*I. pSAC3 que contiene la proteína de fusión N terminal T-20/mTf se somete después a electroporación en levadura para producción de proteínas.

### **Fusión 3'**

15 De la misma manera, la fusión de T-20 se fusiona con el extremo 3' de T-20 usando cebadores solapantes con salientes de sitios de restricción, tales como *Sal*I y *Hind*III y otras enzimas de restricción, en cada extremo. Una vez hibridado, este fragmento se clona en un vector diseñado específicamente, pREX0001, usando sitios de restricción tales como sitios de *Sal*I y *Hind*III. Después de la identificación del clon correcto mediante secuenciación, el plásmido se corta con *Sal*I y *Hind*III y el fragmento se subclona en pREX0004 que se diseña específicamente con sitios *Sal*I y *Hind*III únicos para permitir la fusión de proteína terapéutica con el extremo C terminal de mTf. El plásmido resultante es pREX0017. pREX0017 se corta después con enzimas apropiadas tales como *Pst*I y *Age*I para retirar el casete de T-20/mTf del vector. El casete de T-20/mTf se subclona en un vector de levadura, tal como pSAC3, para expresión en levadura.

25 Específicamente, los siguientes cebadores solapantes con salientes de restricción se diseñan para producir la fusión de T-20 con el extremo C terminal de mTf:



Los cebadores solapantes tienen las siguientes secuencias:

30

P0044:

TCGACCTTACACTAGCTTAATACAC (SEC ID N°: 24)

35

P0045:

TGCGATTCTTCAATTAAGGAGTGATTAAGCTAGTGTAAGG (SEC ID N°: 25)

40

P0040:

TCCTTAATTGAAGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATG (SEC ID N°: 26)

P0041:

45

TAATCCAATAATTCTTGTTTCATTCTTTCTTGCTGGTTT (SEC ID N°: 27)

P0046:

**AACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTT  
AATA (SEC ID N°: 28)**

50

P0047:

AGCTTATTAACCAATTCCACAAACTTGCCCATTTATC (SEC ID N°: 29)

55 Los cebadores se hibridan a 65 °C y se ligan en el vector diseñado específicamente cortado con *Sal*I y *Hind*III. Después de la identificación de un clon correcto por secuenciación, el clon correcto se aumenta de masa y se digiere

con otro par de enzimas de restricción apropiadas tales como *PsiI* y *AgeI* para retirar el casete que codifica la proteína de fusión de extremo C terminal de mTf/T-20 del vector. Este casete se liga en un vector de levadura, tal como pSAC3, cortado con *PsiI* y *AgeI*. pSAC3 que contiene la proteína de fusión de T-20/mTf se introduce después por electroporación en levadura para producción de proteínas.

5

**Modificaciones del extremo C terminal**

Se realizan modificaciones en el extremo 3' de mTf para determinar si efectuarían un aumento en los niveles de expresión de fusión, actividad de la fusión de T-20 y/o mejorarían la movilidad del péptido en el extremo C terminal de mTf.

10

Delección de RRP

En la primera etapa, se retira la prolina en el extremo 3' de mTf. Además de la prolina, se retiran los dos restos de arginina adyacentes ya que pueden presentar un sitio de escisión de proteasa Kex2p potencial. La secuencia suprimida se muestra en el alineamiento posterior del inserto de fusión de T-20 mTf 3' no modificado (pREX0017, SEC ID N°: 31) y el inserto de fusión de T-20 mTf 3' con delección de RRP (pREX0032, SEC ID N°: 30):

15

```
caaggctggttgtaacctgagaaaatgctccacctcatcactcctggaagcctgcacttt
caaggctggttgtaacctgagaaaatgctccacctcatcactcctggaagcctgcacttt
```

ArgArgPro

```
C-----tacactagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaaga
ccgtcgaccttacactagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaaga
```

```
aaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttggtggaattggtttta
aaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttggtggaattggtttta
```

ataa (pREX0032: SEC ID N°: 30)

ataa (pREX0017: SEC ID N°: 31)

20

Específicamente, la secuencia de RRP se suprime usando cebadores homólogos de regiones adyacentes de la secuencia. Los cebadores usados para generar la delección son:

P0060:

25

TCATCACTCCTGGAAGCCTGCACTTTCTACACTAGCTTAATACACTCCTT (SEC ID N°: 32)

P0061:

30

AAGGAGTGATTAAGCTAGTGTAGAAAGTGCAGGCTCCAGGAGTGATGA (SEC ID N°: 33)

Se realiza una reacción de PCR mutagénica usando los cebadores externos y pREX0017 como el molde para generar un producto que carece de las 9 bases que codifican RRP. Este producto se corta después con *SphI/HindIII* y se clona en pREX0017 cortado con *SphI/HindIII* para realizar pREX0032. pREX0032 se corta después con *AgeI/PsiI*, se subclona en un vector de levadura tal como pSAC3 y se transforma en levadura para expresión de proteínas.

35

Eliminación de disulfuro C402-C674

En la siguiente etapa, se retira el enlace disulfuro que alcanza entre Cys402 y Cys674 en la molécula de mTF. Esto se consigue mutando ambos restos de cisteína a restos de glicina. En primer lugar, usando cebadores mutagénicos Cys402 se muta a Gly. Los cebadores mutagénicos son:

40

P0064:

45

TGTGCTACATAGCGGGCAAGGGTGGTCTGGTGCCTGTCTTG (SEC ID N°: 34)

P0065:

50

CAAGACAGGCACCAGACCACCTTGCCCGCTATGTAGACAA (SEC ID N°: 35)

## ES 2 547 925 T3

Se realiza una reacción de PCR usando los cebadores externos y pREX0017 como el molde para generar el producto con la mutación deseada. Este producto se corta después con *HpaI/PstI* y se clona de vuelta a pREX0017 realizando un intermedio de Gly402, pREX0039. A continuación, Cys674 se muta a Gly674 siguiendo el mismo procedimiento y usando pREX0004 como un molde y los siguientes cebadores:

5

P0068:

TCCACCTCATCACTCCTGGAAGCCGGTACTTTCCGTCGACCTTAA (SEC ID N°: 36)

10

P0069:

CTTATTAAGGTCGACGGAAAGTACCGGCTTCCAGGAGTGATGAGGTGG (SEC ID N°: 37)

15

El producto resultante se corta con *SphI/HindIII* y se subclona en el nuevo intermedio de Gly402, pREX0039, realizando pREX0038. El plásmido no contiene el péptido de T-20 lo que lo hace útil en el futuro para otras fusiones de mTf. Para insertar el péptido de T-20 en pREX0038, el fragmento de *Sall/Agel* de pREX0017 se clona para formar pREX0034. pREX0034 se cortó después con *Agel/Psi I*. El casete se subclona en un vector de levadura, tal como pSAC3, y se transforma en levadura para expresión de proteínas. Las mutaciones se muestran en el alineamiento posterior de inserto de plásmido de fusión de T-20 mTf 3' no modificado (pREX0017) y el inserto de fusión de T-20 mTf 3' con delección de disulfuro C402-C674:

20

```

                                Cys
pREX0017 1501 tagcgggcaagtgtggtotggtgcctgtcttggcagaaaactacaataag
pREX0034 1501 tagcgggcaagggtggtotggtgcctgtcttggcagaaaactacaataag
                                Gly
(SEC ID N°: 38)
(SEC ID N°: 39)
```

```

                                Cys
pREX0017 2301 tgctccacctcatcaactcctggaagcctgcactttccgctcgaccttacac
pREX0034 2301 tgctccacctcatcaactcctggaagcctgtactttccgctcgaccttacac
                                Gly
(SEC ID N°: 40)
(SEC ID N°: 41)
```

### Combinación de eliminación de disulfuro y RRP

25

En la tercera etapa, se combinan delección de RRP y la delección del disulfuro C402-C674. Para empezar, se prepara un plásmido intermedio, pREX0041, igual que pREX0032 con la excepción de que la mutación de Cys674 estaba presente en los cebadores. Se usan los siguientes cebadores:

30

P0066:

TCCACCTCATCACTCCTGGAAGCCGGCACTTTCTACACTAGCTTAATA (SEC ID N°: 42)

35

P0067:

GTGTATTAAGCTAGTGTAGAAAGTACCGGCTTCCAGGAGTGATGAGGT (SEC ID N°: 43)

40

pREX0041 se corta después con *SphI/HindIII* y se subclona en pREX0039 para crear pREX0033. pREX0033 se corta después con *Agel/PsiI*. El casete se subclona en un vector de levadura, tal como pSAC3, y después se transforma en levadura para expresión de proteínas. El siguiente alineamiento de la fusión de mTf 3' T-20 de pREX0033 con pREX0017 muestra las mutaciones del producto resultante.

		Cys
pREX0017	1501	tagcgggcaaggtgtggtctggtgacctgtcttggcagaaaactacaataag
pREX0033	1501	tagcgggcaaggtgtggtctggtgacctgtcttggcagaaaactacaataag
		Gly

(SEC ID N°: 38)  
(SEC ID N°: 39)

		Cys	ArgArgPro
pREX0017	2301	tgctccacctcatcactcctggaagcctgcacttttcgctcgaccttacac	
pREX0033	2301	tgctccacctcatcactcctggaagcctgcacttttcgctcgaccttacac	
		Gly	

(SEC ID N°: 40)  
(SEC ID N°: 44)

**Farmacocinética de mTf-T20 en conejos**

5 T20 se fusionó con el extremo C terminal de mTf por el método descrito anteriormente para generar la proteína de fusión de mTf-T20. Se inyectaron 50 µg de la proteína de fusión de mTf-T20 por vía intravenosa en conejos blancos de Nueva Zelanda y en los momentos indicados (véase Figura 4) se retiraron 3 ml de sangre y el plasma se separó y se congeló. Las muestras de plasma se analizaron posteriormente en un ensayo de ELISA que es específico para transferrina humana y no reacciona de forma cruzada con transferrina de conejo endógena. La concentración de mTf-T20 medida a las 2 horas después de la inyección es normalmente la más alta y se consideró como el 100 %.  
10 Todas las otras concentraciones se compararon con la de la muestra de dos horas. Se calculó que la semivida de eliminación era de 44 ± 2 horas. La Figura 4 muestra la farmacocinética de mTf-T20 en dos conejos.

15 MTf tiene una semivida de aproximadamente 14 días en el hombre y 60 horas en los conejos. Por lo tanto, se anticipa una semivida de más de 7 días para mTf-T20 en el hombre que es significativamente más larga que las 2 horas indicadas para T20.

**Ejemplo 2: proteína de fusión de EMP1/transferrina**

20 Se ha mostrado que EMP1 (SEC ID N°: 11) imita la actividad de EPO provocando dimerización del receptor de EPO. El péptido, que es cíclico, no tiene homología con EPO. Para volverse activo, el péptido tiene que actuar en concierto con otro péptido, es decir como un dímero, de modo que se pongan dos copias del receptor en proximidad suficientemente estrecha para formar un complejo activo. Como con muchos péptidos, el dímero peptídico padece una semivida corta y se beneficiaría de la longevidad que proporcionaría la fusión con transferrina. La presente divulgación proporciona proteína de fusión con actividad mimética de EPO. Como ejemplo, la proteína de fusión comprende un péptido EMP1 (SEC ID N°: 11) y transferrina modificada (mTf) con semivida aumentada. La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas de dichas proteínas de fusión para el tratamiento de enfermedades asociadas con producción de glóbulos rojos baja o defectuosa.

30 Fusiones e inserciones de EMP1-mTF

Las fusiones iniciales con mTf comprenden fusiones con los extremos N, C y N y C terminales de mTf. Las fusiones individuales se unirán con el receptor pero no provocarán activación del receptor. La fusión doble, una de las cuales debe ser una composición codónica diferente de la otra para evitar la recombinación, permitirá la unión con el receptor y provocará activación.  
35

El examen del dominio N de Tf humana (identificador de PDB 1A8E) y el modelo de Tf completo AAAoTfwo, generado usando el Servidor de Modelo Swiss ExPasy con el modelo de conejo 1JNF como molde, revela varios sitios potenciales para la inserción de un péptido, bien directamente o bien mediante el reemplazo de varios restos.  
40 Estos sitios están duplicados por sus sitios equivalentes en el dominio C.

N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>
Asp33	Ser105
Asn55	Glu141
Asn75	Asp166
Asp90	Gln184
Gly257	Asp197
Lys280	Lys217
His289	Thr231
Ser298	Cys241

5 Dos de estos bucles son los sitios preferidos en los que el péptido EMP1 puede insertarse; N<sub>1</sub> His289 (286-292) y N<sub>2</sub> Asp166 (162-170). Estas posiciones proporcionan orientación correcta requerida para la unión de las dos mitades del receptor de EPO. Como los sitios de inserción están en los dominios N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> del dominio N, tienen la flexibilidad de la bisagra entre estos dos subdominios, lo que les permite avanzar hasta el receptor.

10 Debido a la similitud estructural entre el dominio de N y C los sitios de inserción equivalentes en el dominio C (C<sub>1</sub> 489-495, C<sub>2</sub> 623-628) también pueden usarse para hacer a la molécula multivalente. Esto se realiza usando varios de los sitios de inserción potenciales indicados anteriormente bien solamente en el dominio N o C o bien por una combinación de sitios en ambos dominios.

```

N2 140 PEPRKPLEKA VANFFSGSCA PCADGTDFFQ LCQLCP---- -GCGCSTLNQ
C1 472 NH-----CR FDEFFSEGCA PGSKKD--SS LCKLCMGSGL NLCEPNNKEG

N2 140 PEPRKPLEKA VANFFSGSCA PCADGTDFFQ LCQLCP---- -GCGCSTLNQ
C1 472 NH-----CR FDEFFSEGCA PGSKKD--SS LCKLCMGSGL NLCEPNNKEG

N1 277 D-KSKE--FQ LFSSPHGKDL LFKDSAHGFL KVPFRMDAKM YLGYEYVTAI
C2 611 NVTDCSGNFC LFRSE-TKDL LFRDDTVCLA KLHDRNTYEK YLGEEYVKAV

N1 277 D-KSKE--FQ LFSSPHGKDL LFKDSAHGFL KVPFRMDAKM YLGYEYVTAI
C2 611 NVTDCSGNFC LFRSE-TKDL LFRDDTVCLA KLHDRNTYEK YLGEEYVKAV
    
```

15 N<sub>1</sub> = SEC ID N°: 13  
 N<sub>2</sub> = SEC ID N°: 14  
 C<sub>1</sub> = SEC ID N°: 15  
 C<sub>2</sub> = SEC ID N°: 16

20 Etapas para producir la proteína de fusión de EMP1/mTf

En este Ejemplo, se introducen por ingeniería genética dos péptidos de EMP1 (SEC ID N°: 11) en el armazón de transferrina usando los ácidos nucleicos codificantes de los péptidos y mTF.

25 1 ggtggtactt actcttgtca ttttgggtcca ttgacttggg tttgtaagcc acaaggtggt  
 g g t y s c h f g p l t w v c k p q g g

secuencia de ácido nucleico: SEC ID N°: 45  
 secuencia de aminoácidos: SEC ID N°: 11

30 Un péptido de EMP1 se introduce por ingeniería genética en mTf entre His289 y Gly290. La duplicación inherente a la molécula de transferrina, siendo los dos dominios especulares entre sí, hace posible introducir por ingeniería genética un segundo péptido de EMP1 en la región duplicada del dominio C, entre Glu625 y Thr626.

```

N 277 D-KSKE--FQ LFSSPHGKDL LFKDSAHGFL KVPFRMDAKM YLGYEYVTAI
C 611 NVTDCSGNFC LFRSE-TKDL LFRDDTVCLA KLHDRNTYEK YLGEEYVKAV
    
```

Dominio N: SEC ID Nº: 13  
 Dominio C: SEC ID Nº: 16

- 5 Como ejemplo, para cada inserción se sintetizan dos cebadores mutagénicos solapantes (véase posteriormente). Usando un vector que contiene el ácido nucleico que codifica mTf, tal como pREX0010, como molde, se realizan reacciones con cada cebador mutagénico y un cebador externo del 5' o 3' del ADNc de Tf. Los productos de estas dos reacciones se mezclaron después y se realizó una reacción adicional con los cebadores externos para unir los dos productos entre sí. El producto de PCR con inserto His289-Gly290 se digiere con *Xba*I y *Hpa*I para ligamiento en  
 10 PREX0010 digerido con *Xba*I/*Hpa*I. El vector resultante se digiere después con *Hpa*I y *Sal*I para ligamiento del producto de PCR con inserto de Glu625-Thr626 digerido con *Hpa*I/*Sal*I.

inserto de His289-Gly290 (SEC ID Nº: 46)

```

                ←-----
2031 agacaaatca[aaagaatttc aactattcag ctctcctcat ggtgggtactt actcttgtca ttttgggtcca
    tctgtttagt tttcttaaag ttgataagtc gagaggagta ccaccatgaa[tgagaacagt aaaaccagggt
                                >>.....EMOm.....>
>.....Tf.....>
>.....dominio N.....>

2101 ttgacttggg tttgtaagcc]acaagggtgt gggaaggacc tgctgtttaa ggactctgcc cacgggtttt
    aactgaacc aaacattcgg tgtccacca ccctcctgg acgacaaatt cctgagacgg]gtgcccaaaa
                                ----->
>.....EMOm.....>>
>.....Tf.....>
>.....dominio N.....>
    
```

inserto de Glu625-Thr626 (SEC ID Nº: 47)

```

                ←-----
3081 cctatttggga agcaacgtaa ctgactgctc[gggcaacttt tgtttgttc ggtcggaagg tggacttac
    ggataaacct tcgttgcat gactgacgag cccgttgaaa acaacaagg ccagccttc accatgaat[g
                                >>...EPOm...>
>.....dominio C.....>
>.....Tf.....>

                KpnI
                -----
3151 tcttgtcatt ttggtccatt gacttgggtt tgtaagccac]aagggtgtac caaggacctt ctgttcagag
    agaacagtaa aaccaggtaa ctgaaccaa acattcggtg ttccaccatg gttcctggaa gacaagtctc
                                ----->
>.....EPOm.....>>
>.....dominio C.....>
>.....Tf.....>

3221 atgacacagt atgtttggcc aaacttcagt acagaaacac atatgaaaa tacttaggag aagaatatgt
    tactgtgtca]tacaaccgg tttgaagtac tgtctttgtg tatactttt atgaatctc ttcttataca
>.....dominio C.....>
>.....Tf.....>
    
```

- 15 El casete que contiene la proteína de fusión de EMP1/mTF se corta del vector con enzimas de restricción apropiadas y se liga en un vector de levadura, tal como pSAC35. pSAC35 se transforma en levadura para expresión de proteínas.

- 20 Son puntos alternativos para la inserción del péptido o los péptidos miméticos de EPO, o cualquier otro péptido o péptidos los dos sitios de glucosilación en el dominio C de Transferrina en N413 y N611. La ventaja de estos sitios es que una vez que se consigue la inserción, se evita la glucosilación mediante alteración de la secuencia N-X-S/T.

**Ejemplo 3: proteína de fusión de GLP-1/Transferrina**

- 25 GLP-1 es un péptido que regula la secreción de insulina. Posee actividad antidiabética en sujetos humanos que padecen diabetes, especialmente diabetes de tipo II. Como otros péptidos, GLP-1 tiene una semivida en plasma corta en seres humanos. La presente invención proporciona proteínas de fusión con GLP-1 fusionada con mTf con semivida aumentada y composiciones farmacéuticas de dichas proteínas de fusión para el tratamiento de enfermedades asociadas con niveles de glucosa anómalos que pueden administrarse por vía oral.

- 30 La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un análogo de GLP-1 y mTF. En una realización de la invención, el análogo de GLP-1 comprende un resto de His adicional en el extremo N terminal.

El resto de His podría añadirse al extremo N terminal de GLP-1 o insertarse después del resto de His en el extremo N terminal de GLP-1. En otra realización, el análogo de GLP-1 comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 2. Por ejemplo, la Ala en el péptido GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37) (SEC ID N°: 6) se sustituye con otro aminoácido.

5 En este ejemplo, se describen las etapas para producir una proteína de fusión de GLP-1/mTf. Las mismas etapas pueden usarse para generar proteínas de fusión de transferrina con análogos de los péptidos de GLP-1.

10 Para producir la proteína de fusión de GLP-1/mTf, puede usarse la secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-36) y GLP-1(7-37).

haegtfsdvssylegqaakefiawlvkgr (SEC ID N°: 48)

haegtfsdvssylegqaakefiawlvkgrg (SEC ID N°: 64)

15 Por ejemplo, la secuencia peptídica de GLP-1(7-36) puede retrotraducirse a ADN y optimizarse con respecto a sus codones para levadura:

```
catgctgaagggtacttttacttctgatggtttcttcttattttggaagggtcaagctgctaaagaa
h a e g t f t s d v s s y l e g q a a k e
```

```
tttattgcttggttggttaaaggtaga (SEC ID N°: 49)
f i a w l v k g r (SEC ID N°: 48)
```

20 Los cebadores se diseñaron específicamente para formar extremos adhesivos 5' *XbaI* y 3' *KpnI* después de hibridar y para permitir el ligamiento directo en pREX0052 cortado con *XbaI/KpnI*, inmediatamente 5' del extremo de la secuencia líder y en el extremo N terminal de mTf. Como alternativa, otros extremos adhesivos pueden modificarse técnicamente para ligamientos en otros vectores.

25

```

          XbaI
          -+-----
1  aggtctctag agaaaaggca tgctgaagggt acttttactt ctgatgttct ttcttatttg
   tccagagatc tcttttccgt acgacttcca tgaaaatgaa gactacaaag aagaataaac
   >>.....FL.....>>
       r s l e k r (SEC ID N°: 52)
   (SEC ID N°: 48) >>.....GLP-1.....>
                   h a e g t f t s d v s s y l

                                     KpnI
                                     -----+
61 gaagggtcaag ctgctaaaga atttattgct tgggttggtta aaggtagggt acctgata
   cttccagttc gacgatttct taaataacga accaaccaat ttccatocca tggactat
   >.....GLP-1.....>>
       e g q a a k e f i a w l v k g r
                                     >>..mTf..>>
                                     v p d

```

Cadena superior: SEC ID N°: 50

Cadena inferior: SEC ID N°: 51

30 Cebador de cadena superior: P0056 (nucleótidos 7-112 de SEC ID N°: 50)

Cebador de cadena inferior: P0057 (nucleótidos 9-108 de SEC ID N°: 51)

35 Después de la hibridación y el ligamiento, los clones se secuenciaron para confirmar la inserción correcta. Este vector se designó pREX0094. El casete se cortó de pREX0094 con *NotI* y se subclonó en vector de levadura cortado con *NotI*, pSAC35, para realizar pREX0100.

40 Este plásmido se introdujo después por electroporación en las cepas de levadura hospedadoras de *Saccharomyces* y los transformantes se seleccionaron con respecto a prototrofia de leucina en placas de medio mínimo. Se determinó la expresión por cultivo en medio mínimo líquido y análisis de sobrenadante por SDS-PAGE, transferencia de western y ELISA.

**Ejemplo 4: proteína de IFN-β/transferrina**

IFN-β es eficaz en el tratamiento de diversas enfermedades, tales como, pero sin limitación, esclerosis múltiple, tumor cerebral, cáncer cutáneo y hepatitis B y C. Como la mayoría de las citocinas, IFN-β tiene una semivida en circulación corta. La presente divulgación proporciona proteínas de fusión que comprenden IFN-β fusionado con mTf con semivida y eficacia aumentadas en pacientes. Este ejemplo describe las etapas en la generación de una proteína de fusión de IFN-β/mTf que puede administrarse por vía oral.

En este ejemplo, se fusiona IFNβ-1 con transferrina modificada en los extremos N o C terminales. El clon de IFNβ-1 se obtuvo de la ATCC (Nº 39517). Se usaron cebadores diseñados específicamente para confirmar la secuencia de ADN del clon de IFNβ-1. Estos cebadores fueron externos a la secuencia de ADN de IFNβ-1 y se diseñaron para leer a partir del vector de modo que se obtuviera la secuencia de longitud completa del clon. Los cebadores usados fueron:

- P0070 GCTATGACCAACAAGTGTCTC (SEC ID Nº: 53)
- P0071 CGCACCTGTGGCGCCGGTGATG (SEC ID Nº: 54)

Fusión N terminal

Una vez que se hubo confirmado la secuencia de ADN, se diseñaron cebadores para fusión de IFNβ-1 con mTf. La fusión N terminal fue un proceso de dos etapas. Una fusión directa usando los cebadores con sitios *XbaI* y *KpnI* habría destruido el sitio de *KpnI* y cortado el comienzo de mTf. Se diseñaron un enlazador, cebadores P0082 (nucleótidos 18-48 de SEC ID Nº: 55) y P0083 (nucleótidos 17-39 de SEC ID Nº: 56) para crear un sitio *KpnI* interno en el extremo 3' de IFNβ-1, por una única mutación silenciosa de pb 486 de T a G (en negrita), y con un saliente 5' *XbaI* y 3' GTAC que hibridaría con un sitio *KpnI*. El saliente destruyó el sitio de *KpnI* existente en pREX0052. Los enlazadores se hibridaron y se ligaron en pREX0054 cortado con *XbaI/KpnI*, creando un vector intermedio con mTf no modificado y un sitio *KpnI* que podría usarse para fusionar el gen de IFNβ-1 en el extremo N terminal de mTf.

```

                XbaI           KpnI
                -+-----          -----+
                >>.....P0082.....>>
ctgcttactc taggtctcta gagaaaacag ggtacctccg aaacgtacct gataaaactg
gacgaatgag atccagagat ctcttttgtc ccatggaggc tttgcatgga ctattttgac
                <<.....P0083.....<<
>>.....Mfa-1.....>>
  a y s r s l e k (SEC ID Nº: 57)
                >>....IFN-B-1.....>>
                t g y l r n (SEC ID Nº: 58)
                >>.....mTf.....>
                v p d k t
                (SEC ID Nº: 59)

```

Cadena superior: SEC ID Nº: 55  
 Cadena inferior: SEC ID Nº: 56

Se diseñó un segundo conjunto de cebadores, P0084 (SEC ID Nº: 60) y P0085 (SEC ID Nº: 61), para adaptar los extremos del gen de IFNβ-1 por PCR mutagénica para inserción posterior en el vector intermedio mediante los sitios *XbaI* y *KpnI*. Una digestión con *XbaI/KpnI* de este gen adaptado retiró los últimos 5 aminoácidos de IFNβ-1; sin embargo, estos ya se habían introducido por ingeniería genética en el vector intermedio. La construcción resultante, pREX0048, se creó ligando el gen de IFNβ-1 cortado con *XbaI/KpnI* en el vector intermedio cortado con *XbaI/KpnI*.

P0084 (SEC ID N°: 60)  
 >>-----FL----->>  
 >>-----IFN $\beta$ -1----->>  
 XbaI  
 CTCTAGGTCCTAGAGAAAAGGAGCTACAACCTGCTTGGATTC

P0085 (SEC ID N°: 61)  
 <<-----IFN $\beta$ -1-----<<  
 KpnI  
 GTTTCGGAGGTACCCTGTAAGTCTG

Después de crearse la construcción de pREX0048, esta se secuenció para confirmar la inserción correcta. El casete de expresión, como un fragmento *NotI*, se subclonó después en el vector de levadura cortado con *NotI*, pSAC35, para realizar el pREX0050.

#### Fusión C-terminal

Se usaron cebadores diseñados específicamente, P0086 (SEC ID N°: 62) y P0087 (SEC ID N°: 63), para amplificar por PCR el clon original y, además, adaptar los extremos de IFN $\beta$ -1 para tener sitios *SalI* y *HindIII* en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto recién adaptado se ligó en pREX0052 cortado con *SalI/HindIII* para crear pREX0049.

P0086 (SEC ID N°: 62)  
 >>---mTf--->>  
 >>-----IFN $\beta$ -1----->>  
 SalI  
 ACTTTCCGTCGACCTAGCTACAACCTGCTTGGATTC

P0087 (SEC ID N°: 63)  
 <<-----3' ADH1t-----<< \* \*  
 <<-----IFN $\beta$ -1-----<<  
 HindIII  
 CATAAATCATAAGAATTAGCTTATTAGTTTCGGAGGTAACCTGTAAGT

Después de crearse la construcción de Prex0049, esta se secuenció para confirmar la inserción correcta. El casete de expresión, como un fragmento de *NotI*, se subclonó después en un vector de levadura cortado con *NotI*, tal como pSAC35, para realizar pREX0051.

En un ejemplo, IFN $\beta$ -1 (N° de Referencia de GenBank NM\_002176, SEC ID N°: 65) se hace más estable y soluble mutando Cys17 (en la proteína madura) a Ser. La mutación de Cys 17 a Ser puede realizarse por reacciones mutagénicas rutinarias tales como reacción de PCR mutagénica usando cebadores diseñados específicamente y el ácido nucleico que codifica IFN $\beta$ -1 como el molde.

Además, el IFN $\beta$ -1 se modifica para evitar la glucosilación modificando el sitio de glucosilación ligado a N, NES (restos 80 a 82 de SEC ID N°: 65)/T. Como ejemplo, N podría mutarse a Q y S/T podría mutarse a Ala u otros aminoácidos. Dicha mutagénesis podría realizarse con reacción de PCR mutagénica usando cebadores diseñados específicamente y el ácido nucleico que codifica IFN $\beta$ -1 como el molde.

#### 30 Ejemplo 5: proteínas de fusión de insulina-transferrina

La insulina es una hormona peptídica que se secreta por los islotes de Langerhans en el páncreas y que regula el metabolismo de carbohidratos y grasas, en particular la conversión de glucosa a glucógeno. Se proporciona a seres humanos que padecen diabetes de tipo I y de tipo II, así como a animales diabéticos. En la actualidad, la insulina debe administrarse por inyección subcutánea y tiene una semivida en plasma corta en seres humanos. La presente divulgación proporciona proteínas de fusión de insulina fusionadas con mTf que tienen semivida aumentada y

composiciones farmacéuticas de dichas proteínas de fusión para el tratamiento de enfermedades asociadas con los niveles de glucosa anómalos que pueden administrarse por vía oral.

5 En este ejemplo, se describen las etapas para producir una proteína de fusión de insulina/mTf. Pueden seguirse etapas similares para generar proteínas de fusión de transferrina con análogos de péptidos de insulina.

10 Para expresión en *Saccharomyces* se realizaron inicialmente construcciones en el vector básico pREX0052, que comprendían un vector de clonación de *E. coli* con un casete para expresión de mTf en levadura, como insertos entre los sitios *XbaI/KpnI* 5' para la fusión N terminal o los sitios *SalI/HindIII* 3' para la fusión C terminal.

```

                XbaI          KpnI
                -+-----  -----+
aggtctctag agaagagggt acctgata (SEC ID N°: 67)
tccagagatc tcttctccca tggactat
>>.....FL.....>>
  r s l e k r (SEC ID N°: 69)
                        >>..mTf..>>
                          v p d

                SalI          HindIII
                -+-----  -----+
actttccgtc gaccttaata agcttaattc (SEC ID N°: 68)
tgaaaggcag ctggaattat tcgaattaag
>>.....mTf.....>>
  t f r r p - - (SEC ID N°: 70)
                mADH1t >>.....>>
    
```

15 Estas construcciones forman un casete de expresión con (5' a 3') el promotor de *PRB1* de levadura, secuencia líder que dirige la secreción al medio de cultivo, (fusión N terminal), secuencia de mTf, (fusión C terminal), codones de terminación y la secuencia terminadora de ADH1. Una vez construidos, los casetes de expresión se recuperaron como fragmentos de *NotI* y se insertaron en pSAC35 digerido con *NotI*, un vector lanzadera de levadura/*E. coli*.

La secuencia de insulina usada corresponde a la del N° de Referencia de Genbank NM\_000207, SEC ID N°: 71 (ADN) y 72 (proteína), como se muestra a continuación.

## ES 2 547 925 T3

```

1  gctgcatcag aagaggccat caagcacatc actgtccttc tgccatggcc ctgtggatgc
   cgacgtagtc ttctccgcta gttcgtgtag tgacaggaag acggtaccgg gacacctacg
                                     >>.....INS.....>
                                     >>... líder .....>
                                     m a l w m

61  gcctcctgcc cctgctggcg ctgctggccc tctggggacc tgaccagcc gcagcctttg
   cggaggacgg ggacgaccgc gacgaccggg agacccctgg actgggtcgg cgctcgaaac
   >.....INS.....>
   >.....líder .....>>
   r l l p l l a l l a l w g p d p a a a
                                     >>.>
                                     f

121 tgaaccaaca cctgtgcggc tcacacctgg tggaagctct ctacctagtg tgcggggaac
   acttggttgt ggacaagcgc agtgtggacc accttcgaga gatggatcac acgccccttg
   >.....INS.....>
   >.....B.....>
   v n q h l c g s h l v e a l y l v c g e

181 gaggcttctt ctacacacc aagaccgcc gggaggcaga ggacctgcag gtggggcagg
   ctccgaagaa gatgtgtggg ttctggggcg ccctccgtct cctggacgtc caccocgccc
   >.....INS.....>
                                     r r e a e d l q v g q
   >.....B.....>>
   r g f f y t p k t

241 tggagctggg cgggggccc ggtgcaggca gcctgcagcc cttggccctg gaggggtccc
   acctgcagcc gccccgggga ccacgtccgt cggacgtcgg gaaccgggac ctccccaggg
   >.....INS.....>
   v e l g g g p g a g s l q p l a l e g s

301 tgcagaagcg tggcattgtg gaacaatgct gtaccagcat ctgctccctc taccagctgg
   acgtcttcgc accgtaaacac cttgttacga catggtcgta gacgaggag atggtcgacc
   >.....INS.....>
   l q k r
                                     >>.....A.....>
                                     g i v e q c c t s i c s l y q l

361 agaactactg caactagacg cagcccgcag gcagccccc acccgccgc tctcgcaccg
   tcttgatgac gttgatctgc gtcgggcgctc cgtcgggggg tgggcggcgg aggacgtggc
   >.....INS.....>>
   >.....A.....>>
   e n y c n

421 agagagatgg aataaagccc ttgaaccagc
   tctctctacc ttatttcggg aacttggtcg

```

5 El ADNc para la secuencia anterior puede generarse de varias maneras, por ejemplo, por RT-PCR, a partir de un grupo de ADNc, o por oligonucleótidos sintéticos solapantes. Para generar un clon a partir de un grupo de ADNc, se sintetizaron dos cebadores y se usaron como cebadores de PCR.

cebador 5' 5'-ttgtgaaccaacacctgtcggc-3' (SEC ID N°: 73)  
 cebador 3' 3'-gacgaggagatggtcgacctctgatgacttg-5' (SEC ID N°: 74)

10 Para realizar el inserto N terminal, se usó un cebador mutagénico 5' para crear un segundo producto de PCR usando el primer producto de PCR como molde. Este cebador insertó los últimos 5 aminoácidos de la secuencia líder y el sitio *Xba*I. El sitio *Kpn*I no pudo insertarse por este método, ya que la creación del sitio *Kpn*I habría dado como resultado un cambio de aminoácido. En su lugar, el producto de PCR se digirió con *Xba*I/*Pvu*II. Se realizó después un enlazador de dos oligos solapantes con un extremo 5' *Pvu*II y saliente 3' que se ligarían con el saliente

15 *Kpn*I en pREX0052 digerido con *Kpn*I. Hibridando y ligando este enlazador con el fragmento de PCR digerido y ligando el producto resultante en pREX0052 digerido con *Xba*I/*Kpn*I se generó el plásmido pREX0052 N-insulina (SEC ID N°: 75 y 76, ADN y proteína, respectivamente).

```

                XbaI
                +-+----
1  gcttactcta ggtctctaga taagaggttt gtgaaccaac acctgtgceg ctcacacctg
   cgaatgagat ccagagatct attctccaaa cacttggttg tggacacgcc gagtgtggac
   >>.....FL.....>>
     a y s r s l d k r
                                     >>.....Ins.....>
                                     >>.....B.....>
                                       f v n q h l c g s h l

61  gtggaagctc tctacctagt gtgcggggaa cgaggcttct tctacacacc caagaccgcc
   caccttcgag agatggatca cacgcccctt gctccgaaga agatgtgtgg gttctggggc
   >.....Ins.....>
                                               r
   >.....B.....>
     v e a l y l v c g e r g f f y t p k t

121  cgggaggcag aggacctgca ggtggggcag gtggagctgg gcgggggcc tgggtgcaggc
   gccctcgcgc tcttggaagt ccaccccgtc cacctcgacc cgccccggg accacgtcgc
   >.....Ins.....>
     r e a e d l q v g q v e l g g g p g a g

181  agcctgcagc ccttggccct ggaggggtcc ctgcagaagc gtggcattgt ggaacaatgc
   teggacgtcg ggaaccggga cctcccagg gacgtcttcg caccgtaaca ccttgttacg
   >.....Ins.....>
     s l q p l a l e g s l q k r
                                               >>.....A.....>
                                               g i v e q c

                PvuII
                --+----
241  tgtaccagca tctgctccct ctaccagctg gagaactact gcaacgtac
   acatggctgt agacgagggga gatggctgac ctcttgatga cgttg
   >.....Ins.....>>
   >.....A.....>>
     c t s i c s l y q l e n y c n
                                               >>mTf
                                               v

```

cebador 5': 5'-gcttactctaggtctctagataagaggtttgaaccaacacctgtgcg-3' (SEC ID N°: 77)

5 Enlazadores: 5'-ctggagaactactgcaacgtac-3' (SEC ID N°: 78)

3'-gacctttagtagcgttg-5' (SEC ID N°: 79)

10 Para realizar el inserto C terminal, se usaron cebadores mutagénicos 5' y 3' para crear un segundo producto de PCR usando el primer producto de PCR como molde. Este producto se digirió después con *SalI/HindIII* y se ligó en pREX0052 digerido con *SalI/HindIII*. Esto dio como resultado el plásmido pREX0052 C-insulina (SEC ID N°: 80 y 81).

```

                SalI
                +-+----
1  tgcactttcc gtgcaccttt tgtgaaccaa cacctgtgcg gctcacacct ggtggaagct
   acgtgaaagg cagctggaaa acacttggtt gtggacacgc cgagtgtgga ccaccttoga
   >>.....mTf.....>>
     c t f r r p
                                     >>.....Ins.....>
                                     >>.....B.....>
                                       f v n q h l c g s h l v e a

61  ctctacctag tgtgcgggga acgaggcttc ttctacacac ccaagaccgc cgggagggca
   gagatggatc acacgccctt tctccgaag aagatgtgtg gtttctgggc gccctcgcg
   >.....Ins.....>
                                               r r e a
   >.....B.....>
     l y l v c g e r g f f y t p k t

121  gaggacctgc aggtggggca ggtggagctg gcgggggcc ctgggtgcagg cagcctgcag
   ctctggagc tccacccctt ccacctcgac cgcccccg gaccacgtcc gtcggacgtc
   >.....Ins.....>

```

e d l q v g q v e l g g g p g a g s l q

```

181 cccttggccc tggaggggtc cctgcagaag cgtggcattg tggacaatg ctgtaccagc
    gggaaaccggg acctccccag ggacgtcttc gcaccgtaac accttgttac gacatggctg
>.....Ins.....>
    p l a l e g s l q k r
>>.....A.....>
    g i v e q c c t s
  
```

HindIII

--+----

```

241 atctgctccc tctaccagct ggagaactac tgcaactaat aagcttaatt
    tagacgaggg agatggtcga cctcttgatg acgttgatta ttcgaattaa
>.....Ins.....>
>.....A.....>
    i c s l y q l e n y c n
  
```

mADH1t >>....>>

a -

cebador 5': 5'-tgcactttccgtcgaccttttgaaccaacacctgtgcg-3' (SEC ID N°: 82)

cebador 3': 3'-gacctcttgatgacgttgattatcgaattaa-5' (SEC ID N°: 83)

- 5 Una vez que la secuencia de ADN para los insertos tanto N como C terminales se había comprobado y confirmado, los plásmidos pREX0052 N-insulina y pREX0052 C-insulina se digirieron con *NotI* y se recuperaron los casetes de expresión. Estos se ligaron después en pSAC35 digerido con *NotI* para proporcionar pSAC35 N-insulina y pSAC35 C-insulina. Estos plásmidos se introdujeron después por electroporación en las cepas de levadura de *Saccharomyces* hospedadoras y los transformantes se seleccionaron para prototrofia de leucina en placas de medio mínimo. La expresión se determinó por cultivo en medio mínimo líquido y análisis de sobrenadante por SDS-PAGE, transferencia de western, ELISA y BIAcore.

- 15 Estas construcciones de fusión dan como resultado la producción de proinsulina unida a transferrina. Las proteasas en levadura pueden convertir la proinsulina en insulina a medida que se prepara y se secreta, aunque el producto de expresión final puede contener solamente proinsulina. En ese caso, la proinsulina puede convertirse en insulina después de la expresión usando una proteasa purificada apropiada.

Administración oral de proteína de fusión de insulina/transferrina modificada a ratas

- 20 Para ensayar la actividad de insulina de la proteína de fusión de insulina/mTf se prepararon en primer lugar ratas diabéticas. Se sometieron ratas Sprague-Dawley hembra a ayunas durante 24 horas y su nivel de glucosa en sangre se determinó para establecer una línea basal. Se inyectó después a las ratas por vía intraperitoneal una solución de estreptozotocina (STZ), 60 mg/ml, a una dosificación de 60 mg/kg. Se continúan las inyecciones i.p. de STZ durante cuatro días más, y las ratas con un nivel de glucosa en sangre en ayunas por encima de 300 mg/dl se seleccionan como ratas diabéticas.

- 30 Se preparan soluciones de la proteína de fusión y de insulina solamente en PBS o bicarbonato sódico para proporcionar dosificaciones de 7 a 80 unidades de insulina/kg cuando se administra a ratas. Como control, las ratas también se tratan con PBS solamente. Las soluciones o PBS se administran por sonda oral a ratas después de un ayuno de 12 horas, y se recogen muestras sanguíneas de la cola después de 0, 30 y 60 minutos, y después a intervalos de 2 horas. Se miden los niveles de glucosa en sangre a las 0, 0,5, 1, 3, 5, 7, 9 y 11 horas después de la dosificación con un dispositivo de control de glucosa en sangre diseñado para diabéticos, y se alimenta a las ratas de nuevo a las 11 horas después de la dosis.

- 35 La actividad de la insulina se determina midiendo la reducción en el nivel de glucosa en sangre a lo largo del tiempo, corrigiendo la reducción por cualquier aumento o reducción en las muestras solamente de PBS. Se comparan las actividades de insulina de la proteína de fusión frente a insulina no fusionada.

- 40 Para examinar la captación de la proteína de fusión por receptores de transferrina en la mucosa intestinal, se administran proteína de fusión e insulina no fusionada como control a ratas con diabetes inducida como se ha descrito anteriormente y el transporte se mide usando ELISA de tipo sándwich convencionales y muestras de suero. Como alternativa, se administra la proteína de fusión marcada con <sup>125</sup>I o insulina no fusionada marcada con <sup>125</sup>I a ratas con diabetes inducida a una dosificación de 80 U de insulina/kg por sonda oral, como se ha descrito anteriormente. Se recogen muestras de sangre de la cola después de 0, 30 y 60 minutos, después de intervalos de 2 horas, también como se ha descrito anteriormente, y se analizan muestras de suero por HPLC, usando, por ejemplo,

una columna de Sefacrilo y eluyendo muestras con PBS. También se procesan patrones que contienen transferrina marcada con <sup>125</sup>I, insulina marcada con <sup>125</sup>I y proteína de fusión marcada con <sup>125</sup>I en la columna de Sefacrilo para determinar sus tiempos de elución máximos y números de fracción. Se mide la radiactividad de cada fracción con un contador gamma, y se mide el contenido proteico de cada fracción por la absorbancia a 280 nm. Las muestras de suero de ratas tratadas con la proteína de fusión pueden no mostrar la aparición de la proteína de fusión inmediatamente, ya que puede haber un retardo de varias horas.

#### **Ejemplo 6: preparación de proteínas de fusión de mTf terapéuticas con afinidad por hierro aumentada**

Puede prepararse una proteína de fusión de mTf terapéutica con afinidad por el hierro aumentada. Como ejemplo para preparar proteínas de fusión de transferrina modificada con capacidad de unión a hierro aumentada, puede llevarse a cabo el procedimiento en el Ejemplo 5 anterior con la siguiente modificación. Estas proteínas de fusión pueden usarse para facilitar la captación y la transferencia de la proteína de fusión a través del epitelio gastrointestinal.

Un vector de clonación tal como pREX0052, descrito anteriormente, que contiene la secuencia de mTf se corta con una enzima de restricción, o un par de enzimas de restricción, para retirar una parte del gen de mTf. Usando técnicas convencionales en este campo, este fragmento se somete después a mutagénesis dirigida usando cebadores que introducen una mutación en una posición correspondiente al nucleótido 723 de SEC ID N°: 1, convirtiendo el codón AAG (Lys) en CAG (Gln) o GAG (Glu). De forma similar, se usan cebadores que introducen mutaciones en posiciones correspondientes a los nucleótidos 726 y 728 de SEC ID N°: 1, convirtiendo el codón CAC (His) en CAG (Gln) o GAG (Glu). También pueden usarse cebadores que introducen mutaciones en las tres posiciones de nucleótidos, dando como resultado la sustitución de dos aminoácidos adyacentes. Estas posiciones de nucleótidos corresponden a los aminoácidos 225 y 226 de la proteína codificada con la secuencia líder y a los aminoácidos 206 y 207 de la proteína madura. El fragmento mutado se amplifica después por RT-PCR y se vuelve a ligar en el vector de clonación. Este vector que contiene la mutación o las mutaciones se usa en una etapa posterior para la introducción de una molécula de ADN que codifica la proteína terapéutica. Como se ha descrito en el Ejemplo 5, anterior, la secuencia de proteína de fusión de mTf puede introducirse en vectores de expresión de levaduras y transformarse en *Saccharomyces* u otras levaduras para la producción de proteínas.

Como se ha analizado previamente, también pueden mutarse otros aminoácidos para obtener proteínas mTf terapéuticas con afinidad por hierro aumentada.

#### **Ejemplo 7: proteína de transferrina/receptor de toxina soluble**

Las neurotoxinas clostridiales son sustancias venenosas. La sinaptotagmina I es un receptor de acción amplia de serotipos de neurotoxina de *Clostridium botulinum*. Los aminoácidos 1-53 (SEC ID N°: 4) de sinaptotagmina I son responsables de la unión con diversos serotipos de neurotoxina. Como otros péptidos, un receptor de toxina soluble, tal como los aminoácidos 1-53, tiene una semivida corta. La presente divulgación proporciona una proteína de fusión que comprende mTf fusionada con los aminoácidos 1-53 con semivida aumentada en comparación con el receptor de toxina soluble que tiene SEC ID N°: 1-53.

La presente divulgación proporciona proteínas de fusión con actividad antitoxina y semivida aumentada. Específicamente, en este ejemplo, se produce una proteína de fusión que comprende Tf modificada y un péptido que consiste en los aminoácidos 1-53 (SEC ID N°: 4) de sinaptotagmina I, fusionando una o más copias de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido con la secuencia de nucleótidos de Tf para producción a proteína de fusión con un péptido fusionado con el extremo N o C terminal de Tf.

Para insertar la secuencia que codifica SEC ID N°: 4, el vector pREX0010 con el ADNc de transferrina modificada, se digiere con las enzimas de restricción *Xba* I/*Kpn* I para inserción en el extremo 5' y *Sal* I/*Hind* III para inserción en el extremo 3'.

Para la inserción 5', se sintetizan dos oligos solapantes que forman un saliente *Xba* I en el extremo 5' y un saliente *Kpn* I en el extremo 3' del ácido nucleico que codifica SEC ID N°: 4. Estos oligos se hibridan después entre sí y se ligan en el vector pREX0010 digerido con *Xba* I/*Kpn* I.

Se analizan después transformación, selección y expresión en levadura.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a los ejemplos anteriores, se entiende que pueden realizarse diversas modificaciones.

En consecuencia, la invención se limita solamente por las siguientes reivindicaciones.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PRIOR, Christopher P. LAI, Char-Huei SADEGHI, Homayoun TURNER, Andrew J.

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE TRANSFERRINA MODIFICADA

<130> 54710-5001-01-WO

5

<150> US 60/406.977

<151> 30-08-2002

<150> US 10/378.094

10

<151> 04-03-2003

<160> 90

<170> PatentIn versión 3.2

15

<210> 1

<211> 2318

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20

<220>

<221> CDS

<222> (51)..(2147)

<223> N° de referencia de GenBank NM\_001063, gen y proteína de transferrina

25

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (51)..(107)

30

<400> 1

```

gcacagaagc gagtccgact gtgctcgtcg ctcagcgcgcg caccocggaag atg agg      56
                                                Met Arg
                                                1

ctc gcc gtg gga gcc ctg ctg gtc tgc gcc gtc ctg ggg ctg tgt ctg      104
Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu
          5                10                15

gct gtc cct gat aaa act gtg aga tgg tgt gca gtg tcg gag cat gag      152
Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu
          20                25                30

gcc act aag tgc cag agt ttc cgc gac cat atg aaa agc gtc att cca      200
Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro
          35                40                45                50

tcc gat ggt ccc agt gtt gct tgt gtg aag aaa gcc tcc tac ctt gat      248
Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp
                    55                60                65

tgc atc agg gcc att gcg gca aac gaa gcg gat gct gtg aca ctg gat      296
Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
                    70                75                80

gca ggt ttg gtg tat gat gct tac ctg gct ccc aat aac ctg aag cct      344
    
```

ES 2 547 925 T3

Ala	Gly	Leu	Val	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Leu	Ala	Pro	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro		
		85					90					95					
gtg	gtg	gca	gag	ttc	tat	ggg	tca	aaa	gag	gat	cca	cag	act	ttc	tat		392
Val	Val	Ala	Glu	Phe	Tyr	Gly	Ser	Lys	Glu	Asp	Pro	Gln	Thr	Phe	Tyr		
	100					105					110						
tat	gct	ggt	gct	gtg	gtg	aag	aag	gat	agt	ggc	ttc	cag	atg	aac	cag		440
Tyr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Phe	Gln	Met	Asn	Gln		
115					120					125					130		
ctt	cga	ggc	aag	aag	tcc	tgc	cac	acg	ggg	cta	ggc	agg	tcc	gct	ggg		488
Leu	Arg	Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ala	Gly		
				135					140					145			
tgg	aac	atc	ccc	ata	ggc	tta	ctt	tac	tgt	gac	tta	cct	gag	cca	cgt		536
Trp	Asn	Ile	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Pro	Arg		
			150					155					160				
aaa	cct	ctt	gag	aaa	gca	gtg	gcc	aat	ttc	ttc	tcg	ggc	agc	tgt	gcc		584
Lys	Pro	Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Ala	Asn	Phe	Phe	Ser	Gly	Ser	Cys	Ala		
		165					170					175					
cct	tgt	gcg	gat	ggg	acg	gac	ttc	ccc	cag	ctg	tgt	caa	ctg	tgt	cca		632
Pro	Cys	Ala	Asp	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Gln	Leu	Cys	Pro		
	180					185					190						
ggg	tgt	ggc	tgc	tcc	acc	ctt	aac	caa	tac	ttc	ggc	tac	tcg	gga	gcc		680
Gly	Cys	Gly	Cys	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ala		
195					200					205					210		
ttc	aag	tgt	ctg	aag	gat	ggt	gct	ggg	gat	gtg	gcc	ttt	gtc	aag	cac		728
Phe	Lys	Cys	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His		
				215					220					225			
tcg	act	ata	ttt	gag	aac	ttg	gca	aac	aag	gct	gac	agg	gac	cag	tat		776
Ser	Thr	Ile	Phe	Glu	Asn	Leu	Ala	Asn	Lys	Ala	Asp	Arg	Asp	Gln	Tyr		
			230					235					240				
gag	ctg	ctt	tgc	ctg	gac	aac	acc	cgg	aag	ccg	gta	gat	gaa	tac	aag		824
Glu	Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Asn	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr	Lys		
		245					250					255					
gac	tgc	cac	ttg	gcc	cag	gtc	cct	tct	cat	acc	gtc	gtg	gcc	cga	agt		872
Asp	Cys	His	Leu	Ala	Gln	Val	Pro	Ser	His	Thr	Val	Val	Ala	Arg	Ser		
	260					265					270						
atg	ggc	ggc	aag	gag	gac	ttg	atc	tgg	gag	ctt	ctc	aac	cag	gcc	cag		920
Met	Gly	Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Ile	Trp	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Ala	Gln		
275					280					285					290		
gaa	cat	ttt	ggc	aaa	gac	aaa	tca	aaa	gaa	ttc	caa	cta	ttc	agc	tct		968
Glu	His	Phe	Gly	Lys	Asp	Lys	Ser	Lys	Glu	Phe	Gln	Leu	Phe	Ser	Ser		
				295					300					305			
cct	cat	ggg	aag	gac	ctg	ctg	ttt	aag	gac	tct	gcc	cac	ggg	ttt	tta		1016
Pro	His	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Ala	His	Gly	Phe	Leu		
			310					315					320				
aaa	gtc	ccc	ccc	agg	atg	gat	gcc	aag	atg	tac	ctg	ggc	tat	gag	tat		1064
Lys	Val	Pro	Pro	Arg	Met	Asp	Ala	Lys	Met	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Glu	Tyr		

ES 2 547 925 T3

325	330	335	
gtc act gcc atc cgg aat cta cgg gaa ggc aca tgc cca gaa gcc cca			1112
Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro			
340	345	350	
aca gat gaa tgc aag cct gtg aag tgg tgt gcg ctg agc cac cac gag			1160
Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu			
355	360	365	370
agg ctc aag tgt gat gag tgg agt gtt aac agt gta ggg aaa ata gag			1208
Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu			
	375	380	385
tgt gta tca gca gag acc acc gaa gac tgc atc gcc aag atc atg aat			1256
Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn			
	390	395	400
gga gaa gct gat gcc atg agc ttg gat gga ggg ttt gtc tac ata gcg			1304
Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala			
	405	410	415
ggc aag tgt ggt ctg gtg cct gtc ttg gca gaa aac tac aat aag agc			1352
Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser			
	420	425	430
gat aat tgt gag gat aca cca gag gca ggg tat ttt gct gta gca gtg			1400
Asp Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val			
435	440	445	450
gtg aag aaa tca gct tct gac ctc acc tgg gac aat ctg aaa ggc aag			1448
Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys			
	455	460	465
aag tcc tgc cat acg gca gtt ggc aga acc gct ggc tgg aac atc ccc			1496
Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro			
	470	475	480
atg ggc ctg ctc tac aat aag atc aac cac tgc aga ttt gat gaa ttt			1544
Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe			
	485	490	495
ttc agt gaa ggt tgt gcc cct ggg tct aag aaa gac tcc agt ctc tgt			1592
Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys			
	500	505	510
aag ctg tgt atg ggc tca ggc cta aac ctg tgt gaa ccc aac aac aaa			1640
Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys			
515	520	525	530
gag gga tac tac ggc tac aca ggc gct ttc agg tgt ctg gtt gag aag			1688
Glu Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys			
	535	540	545
gga gat gtg gcc ttt gtg aaa cac cag act gtc cca cag aac act ggg			1736
Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly			
	550	555	560
gga aaa aac cct gat cca tgg gct aag aat ctg aat gaa aaa gac tat			1784
Gly Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr			
	565	570	575

ES 2 547 925 T3

gag ttg ctg tgc ctt gat ggt acc agg aaa cct gtg gag gag tat gcg 1832  
 Glu Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala  
 580 585 590

aac tgc cac ctg gcc aga gcc ccg aat cac gct gtg gtc aca egg aaa 1880  
 Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys  
 595 600 605 610

gat aag gaa gct tgc gtc cac aag ata tta cgt caa cag cag cac cta 1928  
 Asp Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu  
 615 620 625

ttt gga agc aac gta act gac tgc tgc ggc aac ttt tgt ttg ttc cgg 1976  
 Phe Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg  
 630 635 640

tcg gaa acc aag gac ctt ctg ttc aga gat gac aca gta tgt ttg gcc 2024  
 Ser Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala  
 645 650 655

aaa ctt cat gac aga aac aca tat gaa aaa tac tta gga gaa gaa tat 2072  
 Lys Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr  
 660 665 670

gtc aag gct gtt ggt aac ctg aga aaa tgc tcc acc tca tca ctc ctg 2120  
 Val Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu  
 675 680 685 690

gaa gcc tgc act ttc cgt aga cct taa aatctcagag gtagggctgc 2167  
 Glu Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro  
 695

caccaaggtg aagatgggaa cgcagatgat ccatgagttt gccttggttt cactggccca 2227

agtggtttgt gctaaccacg tctgtcttca cagctctgtg ttgccatgtg tgctgaacaa 2287

aaaataaaaa ttattattga ttttatattt c 2318

<210> 2  
 <211> 698  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu  
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu  
 20 25 30

His Glu Ala Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val  
 35 40 45

Ile Pro Ser Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr  
 50 55 60

Leu Asp Cys Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr  
 65 70 75 80

10

ES 2 547 925 T3

Leu Asp Ala Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu  
 85 90 95  
 Lys Pro Val Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr  
 100 105 110  
 Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met  
 115 120 125  
 Asn Gln Leu Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser  
 130 135 140  
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser  
 165 170 175  
 Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu  
 180 185 190  
 Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser  
 195 200 205  
 Gly Ala Phe Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val  
 210 215 220  
 Lys His Ser Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Asp Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala  
 260 265 270  
 Arg Ser Met Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln  
 275 280 285  
 Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe  
 290 295 300  
 Ser Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly  
 305 310 315 320  
 Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr  
 325 330 335  
 Glu Tyr Val Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu  
 340 345 350  
 Ala Pro Thr Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His  
 355 360 365  
 His Glu Arg Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys  
 370 375 380  
 Ile Glu Cys Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile  
 385 390 395 400  
 Met Asn Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr

ES 2 547 925 T3

				405						410					415
Ile	Ala	Gly	Lys	Cys	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	Asn	Tyr	Asn
			420					425					430		
Lys	Ser	Asp	Asn	Cys	Glu	Asp	Thr	Pro	Glu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ala	Val
		435					440					445			
Ala	Val	Val	Lys	Lys	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Thr	Trp	Asp	Asn	Leu	Lys
	450					455					460				
Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Ala	Val	Gly	Arg	Thr	Ala	Gly	Trp	Asn
465					470					475					480
Ile	Pro	Met	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	His	Cys	Arg	Phe	Asp
				485					490						495
Glu	Phe	Phe	Ser	Glu	Gly	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser	Lys	Lys	Asp	Ser	Ser
			500					505					510		
Leu	Cys	Lys	Leu	Cys	Met	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Pro	Asn
		515					520					525			
Asn	Lys	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	Val
	530					535					540				
Glu	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His	Gln	Thr	Val	Pro	Gln	Asn
545					550					555					560
Thr	Gly	Gly	Lys	Asn	Pro	Asp	Pro	Trp	Ala	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Lys
				565					570					575	
Asp	Tyr	Glu	Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Gly	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Glu	Glu
			580					585					590		
Tyr	Ala	Asn	Cys	His	Leu	Ala	Arg	Ala	Pro	Asn	His	Ala	Val	Val	Thr
		595					600					605			
Arg	Lys	Asp	Lys	Glu	Ala	Cys	Val	His	Lys	Ile	Leu	Arg	Gln	Gln	Gln
	610					615					620				
His	Leu	Phe	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Asp	Cys	Ser	Gly	Asn	Phe	Cys	Leu
625					630					635					640
Phe	Arg	Ser	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Arg	Asp	Asp	Thr	Val	Cys
				645					650					655	
Leu	Ala	Lys	Leu	His	Asp	Arg	Asn	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Leu	Gly	Glu
			660					665					670		
Glu	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Gly	Asn	Leu	Arg	Lys	Cys	Ser	Thr	Ser	Ser
		675					680					685			
Leu	Leu	Glu	Ala	Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Pro						
	690					695									

<210> 3  
 <211> 679  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

ES 2 547 925 T3

<221> MISC\_FEATURE

<223> Proteína transferrina madura

<400> 3

5

```

Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala
1          5          10          15

Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser
20          25          30

Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys
35          40          45

Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala
50          55          60

Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val
65          70          75          80

Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr
85          90          95

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu
100         105         110

Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp
115        120        125

Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys
130        135        140

Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro
145        150        155        160

Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly
165        170        175

Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe
180        185        190

Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser
195        200        205

Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu
210        215        220

Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp
225        230        235        240

Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met
245        250        255

Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu
260        265        270

His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro
275        280        285

His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys

```

ES 2 547 925 T3

290						295									300
Val	Pro	Pro	Arg	Met	Asp	Ala	Lys	Met	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Val
305					310					315					320
Thr	Ala	Ile	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Pro	Glu	Ala	Pro	Thr
				325					330					335	
Asp	Glu	Cys	Lys	Pro	Val	Lys	Trp	Cys	Ala	Leu	Ser	His	His	Glu	Arg
			340					345					350		
Leu	Lys	Cys	Asp	Glu	Trp	Ser	Val	Asn	Ser	Val	Gly	Lys	Ile	Glu	Cys
		355					360					365			
Val	Ser	Ala	Glu	Thr	Thr	Glu	Asp	Cys	Ile	Ala	Lys	Ile	Met	Asn	Gly
	370					375					380				
Glu	Ala	Asp	Ala	Met	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Phe	Val	Tyr	Ile	Ala	Gly
385				390						395					400
Lys	Cys	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	Asn	Tyr	Asn	Lys	Ser	Asp
			405						410					415	
Asn	Cys	Glu	Asp	Thr	Pro	Glu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ala	Val	Ala	Val	Val
			420					425					430		
Lys	Lys	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Thr	Trp	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys
		435					440					445			
Ser	Cys	His	Thr	Ala	Val	Gly	Arg	Thr	Ala	Gly	Trp	Asn	Ile	Pro	Met
	450					455					460				
Gly	Leu	Leu	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	His	Cys	Arg	Phe	Asp	Glu	Phe	Phe
465				470						475					480
Ser	Glu	Gly	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser	Lys	Lys	Asp	Ser	Ser	Leu	Cys	Lys
			485						490					495	
Leu	Cys	Met	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Pro	Asn	Asn	Lys	Glu
		500						505					510		
Gly	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	Val	Glu	Lys	Gly
		515					520					525			
Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His	Gln	Thr	Val	Pro	Gln	Asn	Thr	Gly	Gly
	530					535					540				
Lys	Asn	Pro	Asp	Pro	Trp	Ala	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Lys	Asp	Tyr	Glu
545					550					555					560
Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Gly	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Glu	Glu	Tyr	Ala	Asn
			565						570					575	
Cys	His	Leu	Ala	Arg	Ala	Pro	Asn	His	Ala	Val	Val	Thr	Arg	Lys	Asp
			580					585					590		
Lys	Glu	Ala	Cys	Val	His	Lys	Ile	Leu	Arg	Gln	Gln	Gln	His	Leu	Phe
		595					600					605			
Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Asp	Cys	Ser	Gly	Asn	Phe	Cys	Leu	Phe	Arg	Ser
	610					615					620				

ES 2 547 925 T3

Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys  
 625 630 635 640  
 Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val  
 645 650 655  
 Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu  
 660 665 670  
 Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro  
 675

5 <210> 4  
 <211> 53  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Aminoácidos 1-53 of sinaptotagmina I

<400> 4

Met Val Ser Glu Ser His His Glu Ala Leu Ala Ala Pro Pro Val Thr  
 1 5 10 15  
 Thr Val Ala Thr Val Leu Pro Ser Asn Ala Thr Glu Pro Ala Ser Pro  
 20 25 30  
 Gly Glu Gly Lys Glu Asp Ala Phe Ser Lys Leu Lys Glu Lys Phe Met  
 35 40 45  
 Asn Glu Leu His Lys  
 50

15 <210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Variante de corte y empalme de lactoferrina de neutrófilo

25 <400> 5

Glu Asp Cys Ile Ala Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala  
 1 5 10

30 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Péptido de tipo glucagón

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 547 925 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (37)..(37)  
 <223> Xaa puede ser Gly en GLP-1 o NH2 en GLP-2

5  
 <400> 6

```

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
          20           25           30
  
```

10  
 <210> 7  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Molécula de GLP-1 que tiene actividad insulínica  
 <400> 7

```

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys
          20           25
  
```

20  
 <210> 8  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Molécula de GLP-1 que tiene actividad insulínica  
 <400> 8

```

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly
          20           25
  
```

30  
 <210> 9  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Análogo de GLP-1

40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa puede ser Ala, Gly, Val, Thr, Ile o alfa-metil-Ala

45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Xaa puede ser Glu, Gln, Ala, Thr, Ser o Gly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa puede ser Glu, Gln, Ala, Thr, Ser o Gly

5  
 <400> 9

Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Xaa Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
 20 25

10 <210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Dominio EPO  
 <400> 10

Cys Arg Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys  
 1 5 10

20 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido EMP1  
 30 <400> 11

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Gln Gly Gly  
 20

35 <210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido EMP20  
 <400> 12

Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10

45 <210> 13  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 547 925 T3

<223> Subdominio N1 de transferrina

<400> 13

```

Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro His Gly Lys Asp
1          5          10          15
Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys Val Pro Pro Arg
          20          25          30
Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val Thr Ala Ile
          35          40          45

```

5

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<220>

<221> misc\_feature

<223> Subdominio N2 de transferrina

15

<400> 14

```

Pro Glu Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser
1          5          10          15
Gly Ser Cys Ala Pro Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys
          20          25          30
Gln Leu Cys Pro Gly Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln
          35          40          45

```

20

<210> 15

<211> 42

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<221> misc\_feature

<223> Subdominio C1 de transferrina

<400> 15

```

Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly
1          5          10          15
Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu
          20          25          30
Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu Gly
          35          40

```

30

<210> 16

<211> 49

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<221> misc\_feature

<223> Subdominio C2 de transferrina

40

ES 2 547 925 T3

<400> 16

```

Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser Glu Thr
1          5          10          15
Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys Leu His
          20          25          30
Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys Ala
          35          40          45
Val

```

5 <210> 17  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

10 <220>  
 <223> Péptido antifusogénico T-20 de VIH

<400> 17

```

Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln
1          5          10          15
Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu
          20          25          30
Trp Asn Trp Phe
          35

```

15 <210> 18  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador P0038

25 <400> 18  
 ctagagaaaa ggtacactag ctaatacac 30

30 <210> 19  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador P0039

35 <400> 19  
 tgcgattctt caattaagga ggtattaag ctagtgtacc ttttct 46

40 <210> 20  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador P0040

<400> 20

ES 2 547 925 T3

tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg 40

5 <210> 21  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador P0041

<400> 21  
 taattccaat aattcttgtt cattctttc ttgctggtt 40

15 <210> 22  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador P0042

<400> 22  
 aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtg gaattggttt gtac 54

25 <210> 23  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador P0043

<400> 23  
 aaaccaattc cacaaacttg cccatttatc 30

35 <210> 24  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador P0044

45 <400> 24  
 tcgaccttac actagcttaa tacac 25

50 <210> 25  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador P0045

55 <400> 25  
 tgcgattctt caattaagga gtgtattaag ctagtgtaag g 41

60 <210> 26  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Cebador P0040

<400> 26

ES 2 547 925 T3

tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg 40

5 <210> 27  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador P0041

<400> 27  
 taattccaat aattctgtt cattctttc ttgctggtt 40

15 <210> 28  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador P0046

<400> 28  
 aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagttgtg gaattggtt taata 55

25 <210> 29  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador P0047

35 <400> 29  
 agcttattaa aaccaattcc acaaactgc ccatttatc 39

40 <210> 30  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Inserto de pREX0032

<400> 30

**caaggctggt ggtaacctga gaaaatgctc cacctcatca ctccctggaag cctgcacttt 60**

**ctacactagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga 120**

**acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgggg aattggtttt aataa 175**

50 <210> 31  
 <211> 184  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Inserto de pREX0017

<400> 31

ES 2 547 925 T3

	caaggctggt ggtaacctga gaaaatgctc cacctcatca ctcttggaag cctgcacttt	60
	ccgtcgacct tacactagct taatacactc cttaattgaa gaatcgcaaa accagcaaga	120
	aaagaatgaa caagaattat tgggaattaga taaatgggca agtttggtgga attgggtttta	180
	ataa	184
5	<210> 32 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador P0060	
	<400> 32 tcactctcc tggagcctg cactttctac actagcttaa tacactcctt	50
15	<210> 33 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador P0061	
	<400> 33 aaggagtga ttaagctagt gtgaaagtg caggctcca ggagtgatga	50
25	<210> 34 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador P0064	
35	<400> 34 ttgtctacat agcgggcaag ggtggtctgg tgctgtctt g	41
40	<210> 35 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador P0065	
	<400> 35 caagacaggc accagaccac cctgcccgc tatgtagaca a	41
50	<210> 36 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador P0068	
	<400> 36 tccacctcat cactctgga agccgttact tccgtcgac cttaa	45
60	<210> 37 <211> 48 <212> ADN	

# ES 2 547 925 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador P0069  
 5  
 <400> 37  
 cttattaagg tcgacggaaa gtaccggctt ccaggagtga tgagggtg 48  
 <210> 38  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Plásmido pREX0017 que comienza en 1501  
 15  
 <400> 38  
 tagcgggcaa ggtggtctg gtcctgtct tggcagaaaa ctacaataag 50  
 20  
 <210> 39  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Plásmido pREX0034 que comienza en 1501  
 30  
 <400> 39  
 tagcgggcaa ggtggtctg gtcctgtct tggcagaaaa ctacaataag 50  
 35  
 <210> 40  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Plásmido pREX0017 que comienza en 2301  
 <400> 40  
 tgctccacct catcactct ggaagcctgc acttccgtc gaccttacac 50  
 45  
 <210> 41  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Plásmido pREX0034 que comienza en 2301  
 <400> 41  
 tgctccacct catcactct ggaagccggt acttccgtc gaccttacac 50  
 55  
 <210> 42  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Cebador P0066  
 <400> 42  
 tccacctcat cactcctgga agccggcact ttctacacta gcttaata 48  
 65  
 <210> 43  
 <211> 48  
 <212> ADN

ES 2 547 925 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador P0067

5

<400> 43  
ggtattaag ctagtgtaga aagtaccggc ttccaggagt gatgaggt 48

10

<210> 44  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Plásmido pREX0033 que comienza en 2301

<400> 44  
tgctccacct catcactct ggaagccggt actttctaca c 41

20

<210> 45  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético que codifica péptido con actividad EPO

<400> 45  
ggtggtactt actctgtca tttggtcca ttgactggg ttgtaagcc acaaggtggt 60

30

<210> 46  
<211> 140  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Producto de PCR con inserto de His289-Gly290

<400> 46

40

**agacaaatca aaagaatttc aactattoag ctctcctcat ggtggtactt actcttgtca 60**

**ttttggtcca ttgactggg ttgtaagcc acaaggtggt ggaaggacc tgctgtttaa 120**

**ggactctgcc cacgggtttt 140**

45

<210> 47  
<211> 210  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> Producto de PCR con inserto de Glu625-Thr626

<400> 47

**cctatttggga agcaacgtaa ctgactgctc gggcaacttt tgtttgttcc ggtcggaagg 60**

**tggtacttac tcttgtcatt ttggtccatt gacttggggt tgtaagccac aaggtggtac 120**

**caaggacctt ctgttcagag atgacacagt atgtttggcc aaacttcatg acagaaacac 180**

**atatgaaaaa tacttaggag aagaatatgt 210**

ES 2 547 925 T3

<210> 48  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido de tipo glucagón-1  
 <400> 48  
 10  

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

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

  
 <210> 49  
 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Secuencia que codifica péptido de tipo glucagón-1  
 20  
 <400> 49  

	catgctgaag gtactttttac ttctgatggt tcttcttatt tggaagggtca agctgctaaa	60
	gaatttattg cttggttggt taaaggtaga	90

  
 <210> 50  
 <211> 118  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético de cadena superior  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(112)  
 <223> Cebador P0056 de cadena superior  
 35  
 <400> 50  

	aggctctctag agaaaaggca tgctgaaggt acttttactt ctgatgtttc ttcttatttg	60
	gaagggtcaag ctgctaaaga atttattgct tgggttggtta aaggtagggt acctgata	118

  
 <210> 51  
 <211> 118  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético de cadena inferior  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(108)  
 <223> Cebador P0057 de cadena inferior  
 55  
 <400> 51

ES 2 547 925 T3

tatcaggtac cctaccttta accaaccaag caataaatc tttagcagct tgaccttcca 60  
 aataagaaga aacatcagaa gtaaaagtac cttcagcatg ccttttctct agagacct 118

5 <210> 52  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido flanqueante N terminal codificado por pREX00052  
 <400> 52

**Arg Ser Leu Glu Lys Arg**  
**1 5**

15 <210> 53  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador P0070

25 <400> 53  
 gctatgacca acaagtgtc c 21

30 <210> 54  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador P0071

35 <400> 54  
 cgcacctgtg ggc ccggtga tg 22

40 <210> 55  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia para fusión de IFN Beta-1 con mTf

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(48)  
 <223> Secuencia del cebador P0082

50 <400>. 55  
 ctgcttactc taggtctcta gagaaaacag ggtacctccg aaacgtacct gataaaactg 60

55 <210> 56  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Secuencia para fusión de IFN Beta-1 con mTf

ES 2 547 925 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(39)  
 <223> Secuencia del cebador P0083  
 5  
 <400> 56  
 cagttttatc aggtacgttt cggaggtacc ctgttttctc tagagaccta gagtaagcag 60  
 <210> 57  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Secuencia de MFa-1  
 15  
 <400> 57  
 Ala Tyr Ser Arg Ser Leu Glu Lys  
 1 5  
 20  
 <210> 58  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia de IFN-B-1  
 <400> 58  
 30  
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
 1 5  
 <210> 59  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Secuencia de mTf  
 40  
 <400> 59  
 Val Pro Asp Lys Thr  
 1 5  
 45  
 <210> 60  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador P0084  
 <400> 60  
 ctctaggtct ctagagaaaa ggagctacaa cttgcttga ttc 43  
 55  
 <210> 61  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>

ES 2 547 925 T3

<223> Cebador P0085

<400> 61  
gtctgaatgt cccatggagg ctttg 25

5

<210> 62  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cebador P0086

<400> 62  
actttcgcgac gacctagcta caacttgctt ggattc 36

15

<210> 63  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Cebador P0087

<400> 63  
tgaatgtcca atggaggctt tgattattc gaattaagaa tactaaatac 50

25

<210> 64  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220> i  
<223> Secuencia de aminoácidos de GLP-1 (7-37)

35

<400> 64

	<b>His</b>	<b>Ala</b>	<b>Glu</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Phe</b>	<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	<b>Asp</b>	<b>Val</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Gly</b>
	<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	
		<b>Gln</b>	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	<b>Lys</b>	<b>Glu</b>	<b>Phe</b>	<b>Ile</b>	<b>Ala</b>	<b>Trp</b>	<b>Leu</b>	<b>Val</b>	<b>Lys</b>	<b>Gly</b>	<b>Arg</b>	<b>Gly</b>
				<b>20</b>						<b>25</b>				<b>30</b>		

40

<210> 65  
<211> 757  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

45

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(564)  
<223> N° de GenBank NM\_002176, interferón-beta 1

50

<400> 65

ES 2 547 925 T3

atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc	48
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser	
1 5 10 15	
act aca gct ctt tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga	96
Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg	
20 25 30	
agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg	144
Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg	
35 40 45	
ctt gaa tat tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag	192
Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu	
50 55 60	
att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc	240
Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile	
65 70 75 80	
tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct	288
Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser	
85 90 95	
agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc	336
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val	
100 105 110	
tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag	384
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu	
115 120 125	
aaa gaa gat ttt acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa	432
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys	
130 135 140	
aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt	480
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser	
145 150 155 160	
cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac	528
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr	
165 170 175	
ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac tga agatctccta	574
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn	
180 185	
gcctgtccct ctgggactgg acaattgctt caagcattct tcaaccagca gatgctgttt	634
aagtgactga tggctaattgt actgcaaattg aaaggacact agaagatttt gaaattttta	694
ttaaattatg agttattttt atttatttaa attttattttt ggaaaataaa ttattttttgg	754
tgc	757

<210> 66  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 66

5

ES 2 547 925 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 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg  
 20 25 30  
 Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg  
 35 40 45  
 Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu  
 50 55 60  
 Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile  
 65 70 75 80  
 Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val  
 100 105 110  
 Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu  
 115 120 125  
 Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys  
 130 135 140  
 Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser  
 145 150 155 160  
 His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr  
 165 170 175  
 Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
 180 185

5 <210> 67  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: región XbaI/KpnI de pREX0052

<400> 67  
 agtctctag agaagagggt acctgata 28

15 <210> 68  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: región SalI/HindIII de pREX0052

<400> 68  
 acttccgtc gaccttaata agcttaattc 30

25 <210> 69  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 547 925 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos codificada por región XbaI/KpnI de pREX0052

5 <400> 69

Arg Ser Leu Glu Lys Arg Val Pro Asp  
1 5

10 <210> 70  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos codificada por región SalI/HindIII de pREX0052

<400> 70

20 Thr Phe Arg Arg Pro  
1 5

25 <210> 71  
<211> 450  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <220>  
<221> CDS  
<222> (45)..(377)  
<223> N° de referencia de GenBank NM\_000207, insulina humana

<400> 71

```

gctgcatcag aagaggccat caagcacatc actgtccttc tgcc atg gcc ctg tgg 56
                                     Met Ala Leu Trp
                                     1

atg cgc ctc ctg ccc ctg ctg gcg ctg ctg gcc ctc tgg gga cct gac 104
Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly Pro Asp
  5          10          15          20

cca gcc gca gcc ttt gtg aac caa cac ctg tgc ggc tca cac ctg gtg 152
Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val
          25          30          35

gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga gcc ttc ttc tac aca ccc 200
Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro
          40          45          50

aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg gag ctg 248
    
```

ES 2 547 925 T3

Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu  
 55 60 65  
 ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg gag ggg 296  
 Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly  
 70 75 80  
 tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc atc tgc 344  
 Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys  
 85 90 95 100  
 tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac tag acgcagcccg caggcagccc 397  
 Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 105 110  
 cccaccggcc gcctcctgca ccgagagaga tggaataaag cccttgaacc agc 450

5 <210> 72  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 72

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

10 <210> 73  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador 5' para clonación de secuencia de insulina  
 20 <400> 73  
 ttgtgaacc aacacctgtg cggc 24  
 <210> 74  
 <211> 34  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

ES 2 547 925 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 3' para clonación de secuencia de insulina

<400> 74  
gttgcagtag ttctccagct ggtagagga gcag 34

5

<210> 75  
<211> 289  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: plásmido pREX0052 N-insulina

15

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(288)

<400> 75

gct tac tct agg tct cta gat aag agg ttt gtg aac caa cac ctg tgc 48  
Ala Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys  
1 5 10 15

ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc 96  
Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly  
20 25 30

ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg 144  
Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val  
35 40 45

ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc 192  
Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro  
50 55 60

ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc 240  
Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys  
65 70 75 80

20

tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac gta c 289  
Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn Val  
85 90 95

25

<210> 76  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: plásmido pREX0052 N-insulina

<400> 76

Ala Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys  
1 5 10 15



ES 2 547 925 T3

tgc act ttc cgt cga cct ttt gtg aac caa cac ctg tgc ggc tca cac 48  
 Cys Thr Phe Arg Arg Pro Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His  
 1 5 10 15

ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc ttc tac 96  
 Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr  
 20 25 30

aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggg cag gtg 144  
 Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val  
 35 40 45

gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg gcc ctg 192  
 Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu  
 50 55 60

gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt acc agc 240  
 Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser  
 65 70 75 80

atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac taataagctt aatt 290  
 Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 85 90

<210> 81  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: plásmido pREX0052 C-insulina

<400> 81

Cys Thr Phe Arg Arg Pro Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His  
 1 5 10 15

Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr  
 20 25 30

Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val  
 35 40 45

Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu  
 50 55 60

Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser  
 65 70 75 80

Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 85 90

<210> 82  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de clonación de insulina 5'

<400> 82  
 tgcaacttcc gtcgaccttt tggaaccaa cacctgtgcg 40

ES 2 547 925 T3

<210> 83  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de clonación de insulina 3'

10

<400> 83  
 aattaagctt attagtgca gtagtctcc ag 32

15

<210> 84  
 <211> 676  
 <212> PRT  
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 84

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

ES 2 547 925 T3

145					150						155				160
Cys	Ala	Asp	Gly	Ala	Asp	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Gln	Leu	Cys	Pro	Gly
				165					170					175	
Cys	Gly	Cys	Ser	Ser	Val	Gln	Pro	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ala	Phe
			180					185					190		
Lys	Cys	Leu	Lys	Asp	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	Gln	Glu
		195					200					205			
Thr	Ile	Phe	Glu	Asn	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Glu	Arg	Asp	Gln	Tyr	Glu
	210					215					220				
Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Asn	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr	Glu	Gln
225					230					235					240
Cys	His	Leu	Ala	Arg	Val	Pro	Ser	His	Ala	Val	Val	Ala	Arg	Ser	Val
				245					250					255	
Asp	Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Ile	Trp	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Ala	Gln	Glu
			260					265				270			
His	Phe	Gly	Lys	Asp	Lys	Ser	Gly	Asp	Phe	Gln	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro
		275					280					285			
His	Gly	Lys	Asn	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Ala	Tyr	Gly	Phe	Phe	Lys
	290					295					300				
Val	Pro	Pro	Arg	Met	Asp	Ala	Asn	Leu	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Val
305					310					315					320
Thr	Ala	Val	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Gly	Ile	Cys	Pro	Asp	Pro	Leu	Gln
				325					330					335	
Asp	Glu	Cys	Lys	Ala	Val	Lys	Trp	Cys	Ala	Leu	Ser	His	His	Glu	Arg
			340					345					350		
Leu	Lys	Cys	Asp	Glu	Trp	Ser	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Ile	Glu	Cys
		355					360					365			
Glu	Ser	Ala	Glu	Thr	Pro	Glu	Asp	Cys	Ile	Ala	Lys	Ile	Met	Asn	Gly
	370					375					380				
Glu	Ala	Asp	Ala	Met	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Tyr	Val	Tyr	Ile	Ala	Gly
385					390					395					400
Gln	Cys	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	Asn	Tyr	Glu	Ser	Thr	Asp
				405					410					415	
Cys	Lys	Lys	Ala	Pro	Glu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Val	Ala	Val	Val	Lys
			420					425					430		
Lys	Ser	Asn	Pro	Asp	Ile	Asn	Trp	Asn	Asn	Leu	Glu	Gly	Lys	Lys	Ser
		435					440					445			
Cys	His	Thr	Ala	Val	Asp	Arg	Thr	Ala	Gly	Trp	Asn	Ile	Pro	Met	Gly
	450					455					460				
Leu	Leu	Tyr	Asn	Arg	Ile	Asn	His	Cys	Arg	Phe	Asp	Glu	Phe	Phe	Arg
465					470					475					480

Gln Gly Cys Ala Pro Gly Ser Gln Lys Asn Ser Ser Leu Cys Glu Leu  
 485 490 495

Cys Ile Gly Pro Ser Val Cys Ala Pro Asn Asn Arg Glu Gly Tyr Tyr  
 500 505 510

Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala  
 515 520 525

Phe Val Lys Ser Gln Thr Val Leu Gln Asn Thr Gly Gly Arg Asn Ser  
 530 535 540

Glu Pro Trp Ala Lys Asp Leu Lys Glu Glu Asp Phe Glu Leu Leu Cys  
 545 550 555 560

Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Ser Glu Ala His Asn Cys His Leu  
 565 570 575

Ala Lys Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Lys Asp Lys Ala Ala  
 580 585 590

Cys Val Lys Gln Lys Leu Leu Asp Leu Gln Val Glu Tyr Gly Asn Thr  
 595 600 605

Val Ala Asp Cys Ser Ser Lys Phe Cys Met Phe His Ser Lys Thr Lys  
 610 615 620

Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Lys Cys Leu Val Asp Leu Arg Gly  
 625 630 635 640

Lys Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Ala Asp Tyr Ile Lys Ala Val  
 645 650 655

Ser Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Arg Leu Leu Glu Ala Cys Thr  
 660 665 670

Phe His Lys His  
 675

<210> 85  
 <211> 676  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 85

Val Pro Asp Lys Thr Val Lys Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Asn  
 1 5 10 15

Thr Lys Cys Ile Ser Phe Arg Asp His Met Lys Thr Val Leu Pro Ala  
 20 25 30

Asp Gly Pro Arg Leu Pro Cys Val Lys Lys Thr Ser Tyr Gln Asp Cys  
 35 40 45

Ile Lys Ala Ile Ser Gly Gly Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly  
 50 55 60

Gly Trp Val Tyr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val  
 65 70 75 80

10

ES 2 547 925 T3

Ala Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Leu Glu His Arg Gln Thr His Tyr Leu  
85 90 95

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Thr Asp Phe Gln Leu Asn Gln Leu  
100 105 110

Gln Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp  
115 120 125

Ile Ile Pro Ile Gly Leu Leu Phe Cys Asn Leu Pro Glu Pro Arg Lys  
130 135 140

Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Ser Phe Phe Ser Gly Ser Cys Val Pro  
145 150 155 160

Cys Ala Asp Pro Val Ala Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly  
165 170 175

Cys Gly Cys Ser Pro Thr Gln Pro Phe Phe Gly Tyr Val Gly Ala Phe  
180 185 190

Lys Cys Leu Arg Asp Gly Gly Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr  
195 200 205

Thr Ile Phe Glu Val Leu Pro Gln Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu  
210 215 220

Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Gln Tyr Glu Asp  
225 230 235 240

Cys Tyr Leu Ala Arg Ile Pro Ser His Ala Val Val Ala Arg Asn Gly  
245 250 255

Asp Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Ile Leu Lys Val Ala Gln Glu  
260 265 270

His Phe Gly Lys Gly Lys Ser Lys Asp Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro  
275 280 285

Leu Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Arg Phe Gly Leu Leu Arg  
290 295 300

Ala Pro Lys Asp Gly Leu Gln Ala Val Pro Arg Pro Gln Leu Cys His  
305 310 315 320

Cys His Ser Lys Ser Ala Gly Ser Cys Pro Asp Ala Ile Asp Ser Ala  
325 330 335

Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His Gln Glu Arg Ala Lys Cys Asp  
340 345 350

Glu Trp Ser Val Thr Gly Asn Gly Gln Ile Glu Cys Glu Ser Ala Glu  
355 360 365

Ser Thr Glu Asp Cys Ile Asp Lys Ile Val Asn Gly Glu Ala Asp Ala  
370 375 380

Met Ser Leu Asp Gly Gly His Ala Tyr Ile Ala Gly Gln Cys Gly Leu  
385 390 395 400

Val Pro Val Met Ala Glu Asn Tyr Asp Ile Ser Ser Cys Thr Asn Pro  
 405 410 415

Gln Ser Asp Val Phe Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys  
 420 425 430

Ala Ser Asp Ser Ser Ile Asn Trp Asn Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser  
 435 440 445

Cys His Thr Gly Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly  
 450 455 460

Leu Leu Phe Ser Arg Ile Asn His Cys Lys Phe Asp Glu Phe Phe Ser  
 465 470 475 480

Gln Gly Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Lys Asn Ser Thr Leu Cys Asp Leu  
 485 490 495

Cys Ile Gly Pro Ala Lys Cys Ala Pro Asn Asn Arg Glu Gly Tyr Asn  
 500 505 510

Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Gln Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala  
 515 520 525

Phe Val Lys His Gln Thr Val Leu Glu Asn Thr Asn Gly Lys Asn Thr  
 530 535 540

Ala Ala Trp Ala Lys Asp Leu Lys Gln Glu Asp Phe Gln Leu Leu Cys  
 545 550 555 560

Pro Asp Gly Thr Lys Lys Pro Val Thr Glu Phe Ala Thr Cys His Leu  
 565 570 575

Ala Gln Ala Pro Asn His Val Val Val Ser Arg Lys Glu Lys Ala Ala  
 580 585 590

Arg Val Ser Thr Val Leu Thr Ala Gln Lys Asp Leu Phe Trp Lys Gly  
 595 600 605

Asp Lys Asp Cys Thr Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser Ser Thr Lys  
 610 615 620

Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Lys Cys Leu Thr Lys Leu Pro Glu  
 625 630 635 640

Gly Thr Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Gly Ala Glu Tyr Leu Gln Ala Val  
 645 650 655

Gly Asn Ile Arg Lys Cys Ser Thr Ser Arg Leu Leu Glu Ala Cys Thr  
 660 665 670

Phe His Lys Ser  
 675

<210> 86  
 <211> 677  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 86

ES 2 547 925 T3

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

ES 2 547 925 T3

					325					330					335
Asp	Asn	Ser	Pro	Val	Lys	Trp	Cys	Ala	Leu	Ser	His	Leu	Glu	Arg	Thr
			340					345					350		
Lys	Cys	Asp	Glu	Trp	Ser	Ile	Ile	Ser	Glu	Gly	Lys	Ile	Glu	Cys	Glu
		355					360					365			
Ser	Ala	Glu	Thr	Thr	Glu	Asp	Cys	Ile	Glu	Lys	Ile	Val	Asn	Gly	Glu
	370					375					380				
Ala	Asp	Ala	Met	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	His	Ala	Tyr	Ile	Ala	Gly	Gln
385					390					395					400
Cys	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Met	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Ser	Asn	Cys
				405					410					415	
Ala	Ile	Pro	Ser	Gln	Gln	Gly	Ile	Phe	Pro	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Val
			420					425						430	
Ala	Val	Val	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ser	Ile	Thr	Trp	Asn	Asn	Leu	Lys
		435					440					445			
Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Gly	Val	Asp	Arg	Thr	Ala	Gly	Trp	Asn
	450					455					460				
Ile	Pro	Met	Gly	Met	Leu	Tyr	Asn	Arg	Ile	Asn	His	Cys	Lys	Phe	Asp
465					470					475					480
Glu	Phe	Phe	Ser	Gln	Gly	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Glu	Lys	Asn	Ser	Thr
				485					490						495
Leu	Cys	Asp	Leu	Cys	Ile	Gly	Pro	Leu	Lys	Cys	Ala	Pro	Asn	Asn	Lys
			500					505					510		
Glu	Glu	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	Val	Glu	Lys
		515					520					525			
Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His	Gln	Thr	Val	Leu	Asp	Asn	Thr	Glu
	530					535					540				
Gly	Lys	Asn	Pro	Ala	Glu	Trp	Ala	Lys	Asn	Leu	Lys	Gln	Glu	Asp	Phe
545					550					555					560
Glu	Leu	Leu	Cys	Pro	Asp	Gly	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Lys	Asp	Phe	Ala
				565					570					575	
Ser	Cys	His	Leu	Ala	Gln	Ala	Pro	Asn	His	Val	Val	Val	Ser	Arg	Lys
			580					585					590		
Glu	Lys	Ala	Ala	Arg	Val	Lys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Gln	Glu	Thr	Leu
		595					600					605			
Phe	Gly	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Gly	Asn	Phe	Cys	Leu	Phe	Lys	Ser	Thr
	610					615					620				
Thr	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Arg	Asp	Asp	Thr	Lys	Cys	Phe	Val	Lys	Leu
625					630					635					640
Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Lys	Tyr	Leu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Met	Gln

ES 2 547 925 T3

				645						650					655
Ser	Val	Gly	Asn	Met	Arg	Lys	Cys	Ser	Thr	Ser	Arg	Leu	Leu	Glu	Ala
			660					665					670		
Cys	Thr	Phe	His	Lys											
				675											

5  
 <210> 87  
 <211> 688  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*  
 <400> 87

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

10

ES 2 547 925 T3

					245						250						255
Arg	Ser	Val	Asp	Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Ile	Trp	Gly	Leu	Leu	Asn	Gln		
			260					265					270				
Ala	Gln	Glu	His	Phe	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Lys	Asp	Phe	His	Leu	Phe		
		275					280					285					
Ser	Ser	Pro	His	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Ala	Leu	Gly		
	290					295					300						
Phe	Leu	Arg	Ile	Pro	Pro	Ala	Met	Asp	Thr	Trp	Leu	Tyr	Leu	Gly	Tyr		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Val	Thr	Ala	Ile	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asp	Ile	Arg	Pro	Glu		
				325					330					335			
Val	Pro	Lys	Asp	Glu	Cys	Lys	Lys	Val	Lys	Trp	Cys	Ala	Ile	Gly	His		
			340					345					350				
His	Glu	Lys	Val	Lys	Cys	Asp	Glu	Trp	Ser	Val	Asn	Ser	Gly	Gly	Asn		
		355					360					365					
Ile	Glu	Cys	Glu	Ser	Ala	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Cys	Ile	Ala	Lys	Ile		
	370					375					380						
Val	Lys	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Met	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Phe	Ile	Tyr		
385					390					395					400		
Ile	Ala	Gly	Lys	Cys	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	Asn	Tyr	Glu		
				405					410					415			
Thr	Arg	Ser	Gly	Ser	Ala	Cys	Val	Asp	Thr	Pro	Glu	Glu	Gly	Tyr	His		
			420					425					430				
Ala	Val	Ala	Val	Val	Lys	Ser	Ser	Ser	Asp	Pro	Asp	Leu	Thr	Trp	Asn		
		435					440					445					
Ser	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Gly	Val	Asp	Arg	Thr	Ala		
	450					455					460						
Gly	Trp	Asn	Ile	Pro	Met	Gly	Leu	Leu	Tyr	Ser	Glu	Ile	Lys	His	Cys		
465					470					475					480		
Glu	Phe	Asp	Lys	Phe	Phe	Arg	Glu	Gly	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Arg	Arg		
				485					490					495			
Asn	Ser	Thr	Leu	Cys	Asn	Leu	Cys	Ile	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly		
			500					505					510				
Arg	Glu	Cys	Glu	Pro	Asn	Asn	His	Glu	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Gly		
		515					520						525				
Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	Val	Glu	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His		
	530					535					540						
Gln	Thr	Val	Glu	Gln	Asn	Thr	Asp	Gly	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Trp	Ala		
545					550					555					560		
Lys	Asp	Leu	Lys	Ser	Glu	Asn	Phe	Lys	Leu	Leu	Cys	Pro	Asp	Gly	Thr		
				565					570					575			

ES 2 547 925 T3

Arg Lys Ser Val Thr Glu Phe Lys Ser Cys Tyr Leu Ala Arg Ala Pro  
 580 585 590

Asn His Ala Val Val Ser Arg Lys Glu Lys Ala Ala Cys Val Cys Gln  
 595 600 605

Glu Leu His Asn Gln Gln Ala Ser Tyr Gly Lys Asn Gly Ser His Cys  
 610 615 620

Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Gln Ser Ala Thr Lys Asp Leu Leu Phe  
 625 630 635 640

Arg Asp Asp Thr Gln Cys Leu Ala Asn Leu Gln Pro Thr Thr Thr Tyr  
 645 650 655

Lys Thr Tyr Leu Gly Glu Lys Tyr Leu Thr Ala Val Ala Asn Leu Arg  
 660 665 670

Gln Cys Ser Thr Ser Arg Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe His Arg Val  
 675 680 685

<210> 88  
 <211> 685  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 88

Asp Pro Glu Arg Thr Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Thr His Glu Ala  
 1 5 10 15

Asn Lys Cys Ala Ser Phe Arg Glu Asn Val Leu Arg Ile Leu Glu Ser  
 20 25 30

Gly Pro Phe Val Ser Cys Val Lys Lys Thr Ser His Met Asp Cys Ile  
 35 40 45

Lys Ala Ile Ser Asn Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Gly Gly  
 50 55 60

Leu Val Tyr Glu Ala Gly Leu Lys Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val Val  
 65 70 75 80

Ala Glu Phe His Gly Thr Lys Asp Asn Pro Gln Thr His Tyr Tyr Ala  
 85 90 95

Val Ala Val Val Lys Lys Asp Thr Asp Phe Lys Leu Asn Glu Leu Arg  
 100 105 110

Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp Asn  
 115 120 125

Ile Pro Met Ala Lys Leu Tyr Lys Glu Leu Pro Asp Pro Gln Glu Ser  
 130 135 140

Ile Gln Arg Ala Ala Ala Asn Phe Phe Ser Ala Ser Cys Val Pro Cys  
 145 150 155 160

Ala Asp Gln Ser Ser Phe Pro Lys Leu Cys Gln Leu Cys Ala Gly Lys  
 165 170 175

10

Gly Thr Asp Lys Cys Ala Cys Ser Asn His Glu Pro Tyr Phe Gly Tyr  
 180 185 190  
 Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Met Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe  
 195 200 205  
 Val Lys His Ser Thr Val Phe Asp Asn Leu Pro Asn Pro Glu Asp Arg  
 210 215 220  
 Lys Asn Tyr Glu Leu Leu Cys Gly Asp Asn Thr Arg Lys Ser Val Asp  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Gln Glu Cys Tyr Leu Ala Met Val Pro Ser His Ala Val Val  
 245 250 255  
 Ala Arg Thr Val Gly Gly Lys Glu Asp Val Ile Trp Glu Leu Leu Asn  
 260 265 270  
 His Ala Gln Glu His Phe Gly Lys Asp Lys Pro Asp Asn Phe Gln Leu  
 275 280 285  
 Phe Gln Ser Pro His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala Asp  
 290 295 300  
 Gly Phe Leu Lys Ile Pro Ser Lys Met Asp Phe Glu Leu Tyr Leu Gly  
 305 310 315 320  
 Tyr Glu Tyr Val Thr Ala Leu Gln Asn Leu Arg Glu Ser Lys Pro Pro  
 325 330 335  
 Asp Ser Ser Lys Asp Glu Cys Met Val Lys Trp Cys Ala Ile Gly His  
 340 345 350  
 Gln Glu Arg Thr Lys Cys Asp Arg Trp Ser Gly Phe Ser Gly Gly Ala  
 355 360 365  
 Ile Glu Cys Glu Thr Ala Glu Asn Thr Glu Glu Cys Ile Ala Lys Ile  
 370 375 380  
 Met Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Tyr Leu Tyr  
 385 390 395 400  
 Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Lys  
 405 410 415  
 Thr Glu Gly Glu Ser Cys Lys Asn Thr Pro Glu Lys Gly Tyr Leu Ala  
 420 425 430  
 Val Ala Val Val Lys Thr Ser Asp Ala Asn Ile Asn Trp Asn Asn Leu  
 435 440 445  
 Lys Asp Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp  
 450 455 460  
 Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Ser Lys Ile Asn Asn Cys Lys Phe  
 465 470 475 480  
 Asp Glu Phe Phe Ser Ala Gly Cys Ala Pro Gly Ser Pro Arg Asn Ser  
 485 490 495

Ser Leu Cys Ala Leu Cys Ile Gly Ser Glu Lys Gly Thr Gly Lys Glu  
 500 505 510

Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe  
 515 520 525

Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Gln Thr  
 530 535 540

Val Ile Gln Asn Thr Asp Gly Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asn  
 545 550 555 560

Leu Lys Lys Glu Asn Phe Glu Val Leu Cys Lys Asp Gly Thr Arg Lys  
 565 570 575

Pro Val Thr Asp Ala Glu Asn Cys His Leu Ala Arg Gly Pro Asn His  
 580 585 590

Ala Val Val Ser Arg Lys Asp Lys Ala Thr Cys Val Glu Lys Ile Leu  
 595 600 605

Asn Lys Gln Gln Asp Asp Phe Gly Lys Ser Val Thr Asp Cys Thr Ser  
 610 615 620

Asn Phe Cys Leu Phe Gln Ser Asn Ser Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp  
 625 630 635 640

Asp Thr Lys Cys Leu Ala Ser Ile Ala Lys Lys Thr Tyr Asp Ser Tyr  
 645 650 655

Leu Gly Asp Asp Tyr Val Arg Ala Met Thr Asn Leu Arg Gln Cys Ser  
 660 665 670

Thr Ser Lys Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe His Lys Pro  
 675 680 685

<210> 89  
 <211> 696  
 <212> PRT  
 <213> *Sus scrofa*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (308)..(308)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 89

Val Ala Gln Lys Thr Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Asn Gln Glu Ala  
 1 5 10 15

Asn Lys Cys Ser Ser Phe Arg Glu Asn Met Ser Lys Ala Val Lys Asn  
 20 25 30

Gly Pro Leu Val Ser Cys Val Lys Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Cys Ile  
 35 40 45

Lys Ala Ile Arg Asp Lys Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala Gly  
 50 55 60

Leu Val Phe Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Asn Leu Lys Pro Val Val

5

10

15

ES 2 547 925 T3

65					70					75				80	
Ala	Glu	Phe	Tyr	Gly	Gln	Lys	Asp	Asn	Pro	Gln	Thr	His	Tyr	Tyr	Ala
				85					90					95	
Val	Ala	Val	Val	Lys	Lys	Gly	Ser	Asn	Phe	Gln	Trp	Asn	Gln	Leu	Gln
			100					105					110		
Gly	Lys	Arg	Ser	Cys	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ala	Gly	Trp	Ile
		115					120					125			
Ile	Pro	Met	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asp	Gln	Leu	Pro	Glu	Pro	Arg	Lys	Pro
	130					135					140				
Ile	Glu	Lys	Ala	Val	Ala	Ser	Phe	Phe	Ser	Ser	Ser	Cys	Val	Pro	Cys
145					150					155					160
Ala	Asp	Pro	Val	Asn	Phe	Pro	Lys	Leu	Cys	Gln	Gln	Cys	Ala	Gly	Lys
				165					170					175	
Gly	Ala	Glu	Lys	Cys	Ala	Cys	Ser	Asn	His	Glu	Pro	Tyr	Phe	Gly	Tyr
			180					185					190		
Ala	Gly	Ala	Phe	Asn	Cys	Leu	Lys	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Phe
		195					200					205			
Val	Lys	His	Ser	Thr	Val	Leu	Glu	Asn	Leu	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Arg
	210					215					220				
Asp	Gln	Tyr	Glu	Leu	Leu	Cys	Arg	Asp	Asn	Thr	Arg	Arg	Pro	Val	Asp
225					230					235					240
Asp	Tyr	Glu	Asn	Cys	Tyr	Leu	Ala	Gln	Val	Pro	Ser	His	Ala	Val	Val
				245					250					255	
Ala	Arg	Ser	Val	Asp	Gly	Gln	Glu	Asp	Ser	Ile	Trp	Glu	Leu	Leu	Asn
			260					265					270		
Gln	Ala	Gln	Glu	His	Phe	Gly	Arg	Asp	Lys	Ser	Pro	Asp	Phe	Gln	Leu
		275					280					285			
Phe	Ser	Ser	Ser	His	Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Ala	Asn
	290					295					300				
Gly	Phe	Leu	Xaa	Ile	Pro	Ser	Lys	Met	Asp	Ser	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gly
305					310					315					320
Tyr	Gln	Tyr	Val	Thr	Ala	Leu	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Ser	Pro
				325					330					335	
Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Glu	Cys	Lys	Lys	Val	Arg	Trp	Cys	Ala	Ile	Gly
			340					345					350		
His	Glu	Glu	Thr	Gln	Lys	Cys	Asp	Ala	Trp	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Gly
		355					360					365			
Lys	Ile	Glu	Cys	Val	Ser	Ala	Glu	Asn	Thr	Glu	Asp	Cys	Ile	Ala	Lys
	370					375					380				
Ile	Val	Lys	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Met	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ile
385					390					395					400

Tyr Ile Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr  
 405 410 415  
 Lys Thr Glu Gly Glu Asn Cys Val Asn Thr Pro Glu Lys Gly Tyr Leu  
 420 425 430  
 Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ser Ser Gly Pro Asp Leu Asn Trp Asn  
 435 440 445  
 Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala  
 450 455 460  
 Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn Ser Cys  
 465 470 475 480  
 Lys Phe Asp Gln Phe Phe Gly Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Gln Arg  
 485 490 495  
 Asn Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Ile Gly Ser Glu Arg Ala Pro Gly  
 500 505 510  
 Arg Glu Cys Leu Ala Asn Asn His Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly  
 515 520 525  
 Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Val Lys Asp  
 530 535 540  
 Gln Val Val Gln Gln Asn Thr Asp Gly Lys Asn Lys Asp Asp Trp Ala  
 545 550 555 560  
 Lys Asp Leu Lys Gln Met Asp Phe Glu Leu Leu Cys Gln Asn Gly Ala  
 565 570 575  
 Arg Glu Pro Val Asp Asn Ala Glu Asn Cys His Leu Ala Arg Ala Pro  
 580 585 590  
 Asn His Ala Val Val Ala Arg Asp Asp Lys Val Thr Cys Val Ala Glu  
 595 600 605  
 Glu Leu Leu Lys Gln Gln Ala Gln Phe Gly Arg His Val Thr Asp Cys  
 610 615 620  
 Ser Ser Ser Phe Cys Met Phe Lys Ser Asn Thr Lys Asp Leu Leu Phe  
 625 630 635 640  
 Arg Asp Asp Thr Gln Cys Leu Ala Arg Val Gly Lys Thr Thr Tyr Glu  
 645 650 655  
 Ser Tyr Leu Gly Ala Asp Tyr Ile Thr Ala Val Ala Asn Leu Arg Lys  
 660 665 670  
 Cys Ser Thr Ser Lys Leu Leu Glu Ala Cys Thr Phe His Ser Ala Lys  
 675 680 685  
 Asn Pro Arg Val Glu Thr Thr Thr  
 690 695

<210> 90  
 <211> 686  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

<400> 90

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

Ile Met Leu Lys Arg Val Pro Ser Leu Met Asp Ser Gln Leu Tyr Leu  
 305 310 315 320

Gly Phe Glu Tyr Tyr Ser Ala Ile Gln Ser Met Arg Lys Asp Gln Leu  
 325 330 335

Thr Pro Ser Pro Arg Glu Asn Arg Ile Gln Trp Cys Ala Val Gly Lys  
 340 345 350

Asp Glu Lys Ser Lys Cys Asp Arg Trp Ser Val Val Ser Asn Gly Asp  
 355 360 365

Val Glu Cys Thr Val Val Asp Glu Thr Lys Asp Cys Ile Ile Lys Ile  
 370 375 380

Met Lys Gly Glu Ala Asp Ala Val Ala Leu Asp Gly Gly Leu Val Tyr  
 385 390 395 400

Thr Ala Gly Val Cys Gly Leu Val Pro Val Met Ala Glu Arg Tyr Asp  
 405 410 415

Asp Glu Ser Gln Cys Ser Lys Thr Asp Glu Arg Pro Ala Ser Tyr Phe  
 420 425 430

Ala Val Ala Val Ala Arg Lys Asp Ser Asn Val Asn Trp Asn Asn Leu  
 435 440 445

Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp  
 450 455 460

Val Ile Pro Met Gly Leu Ile His Asn Arg Thr Gly Thr Cys Asn Phe  
 465 470 475 480

Asp Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Pro Pro Asn Ser  
 485 490 495

Arg Leu Cys Gln Leu Cys Gln Gly Ser Gly Gly Ile Pro Pro Glu Lys  
 500 505 510

Cys Val Ala Ser Ser His Glu Lys Tyr Phe Gly Tyr Thr Gly Ala Leu  
 515 520 525

Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp Val Ala Phe Ile Gln His Ser Thr  
 530 535 540

Val Glu Glu Asn Thr Gly Gly Lys Asn Lys Ala Asp Trp Ala Lys Asn  
 545 550 555 560

Leu Gln Met Asp Asp Phe Glu Leu Leu Cys Thr Asp Gly Arg Arg Ala  
 565 570 575

Asn Val Met Asp Tyr Arg Glu Cys Asn Leu Ala Glu Val Pro Thr His  
 580 585 590

Ala Val Val Val Arg Pro Glu Lys Ala Asn Lys Ile Arg Asp Leu Leu  
 595 600 605

Glu Arg Gln Glu Lys Arg Phe Gly Val Asn Gly Ser Glu Lys Ser Lys  
 610 615 620

ES 2 547 925 T3

Phe	Met	Met	Phe	Glu	Ser	Gln	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Leu
625					630					635					640
Thr	Lys	Cys	Leu	Phe	Lys	Val	Arg	Glu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Lys	Glu	Phe
				645					650					655	
Leu	Gly	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Thr	Cys	Asn
			660					665					670		
Pro	Ser	Asp	Ile	Leu	Gln	Met	Cys	Ser	Phe	Leu	Glu	Gly	Lys		
		675					680					685			

## REIVINDICACIONES

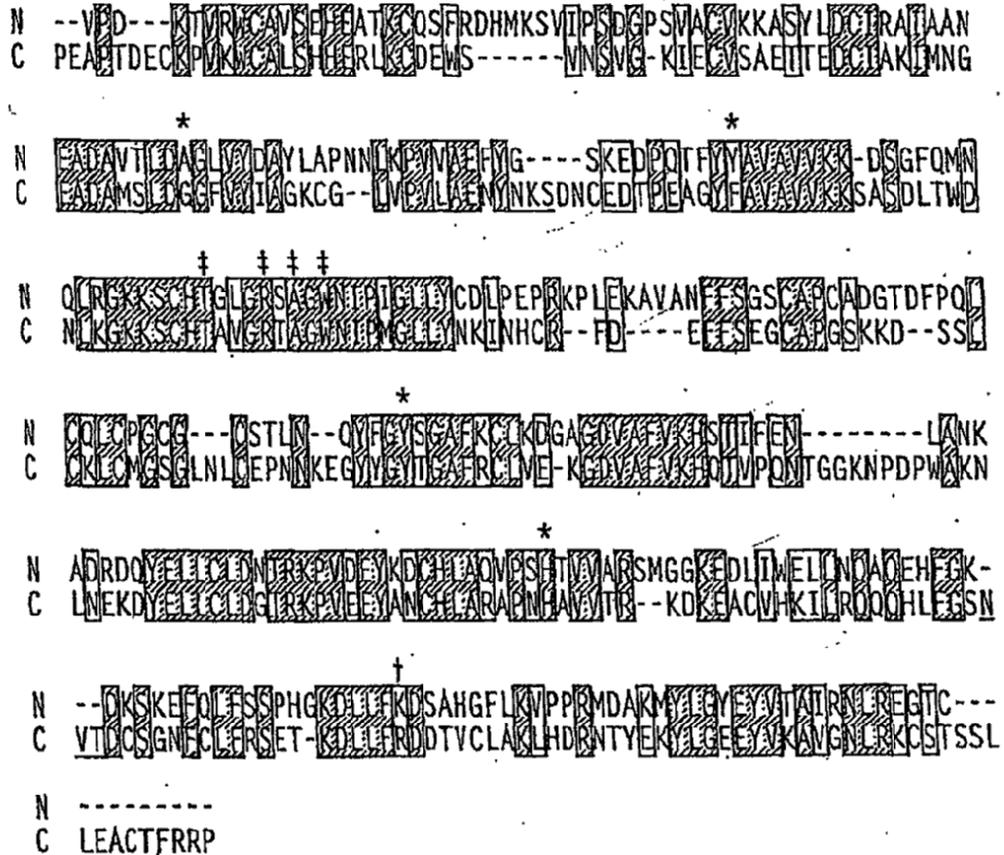
1. Una proteína de fusión que comprende una proteína transferrina modificada (mTf) fusionada con una molécula de péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), en la que la proteína mTf es transferrina humana de SEC ID N°: 3 modificada por sustitución, delección o inserción de aminoácidos de entre 1 y 30 aminoácidos, y en la que la proteína mTf muestra glucosilación reducida, unión a metal reducida o unión a receptor reducida en comparación con transferrina humana de SEC ID N°: 3.
2. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la molécula de GLP-1 está fusionada con el extremo C terminal de mTf, o está fusionada con el extremo N terminal de mTf, o está insertada en al menos un bucle de la mTf, o reemplaza al menos un bucle de la mTf.
3. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína mTf tiene afinidad reducida por o no se une a un receptor de Tf (TfR).
4. Una proteína de fusión que comprende una proteína transferrina modificada (mTf) fusionada con una molécula de péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), en la que la proteína mTf es una proteína Tf modificada por sustitución, delección o inserción de aminoácidos de entre 1 y 30 aminoácidos, y tiene afinidad reducida por o no se une a hierro en comparación con la proteína Tf; y en la que la proteína Tf se selecciona del grupo que consiste en Tf humana (SEC ID N°: 3), Tf de conejo (SEC ID N°: 84), Tf de rata (SEC ID N°: 85), Tf de ratón (SEC ID N°: 86), Tf de caballo (SEC ID N°: 87), Tf bovina (SEC ID N°: 88), Tf de cerdo (SEC ID N°: 89) y Tf de pollo (SEC ID N°: 90).
5. Una proteína de fusión que comprende una proteína transferrina modificada (mTf) fusionada con una molécula de péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), en la que la proteína mTf es transferrina humana de SEC ID N°: 3 modificada por sustitución, delección o inserción de aminoácidos de entre 1 y 30 aminoácidos, y en la que dicha proteína mTf muestra glucosilación reducida o no muestra glucosilación en comparación con la transferrina humana de SEC ID N°: 3.
6. Una proteína de fusión de la reivindicación 1 o de la reivindicación 5, en la que dicha proteína mTf comprende al menos una mutación que evita la glucosilación.
7. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, que se expresa en presencia de tunicamicina.
8. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende además un péptido enlazador.
9. Una proteína de fusión de la reivindicación 8, en la que el péptido enlazador une la molécula de GLP-1 a mTf.
10. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína mTf comprende al menos una sustitución, una delección o una adición de aminoácidos en la región bisagra.
11. Una proteína de fusión de la reivindicación 10, en la que dicha región bisagra se selecciona del grupo que consiste en del resto 94 al resto 96 de SEC ID N°: 3, del resto 245 al resto 247 de SEC ID N°: 3, del resto 316 al resto 318 de SEC ID N°: 3, del resto 425 al resto 427 de SEC ID N°: 3, del resto 581 al resto 582 de SEC ID N°: 3, y del resto 652 al resto 658 de SEC ID N°: 3.
12. Una proteína de fusión de la reivindicación 6, en la que la mutación está dentro del sitio de glucosilación ligado a N que comprende la secuencia Asn-X-Ser/Thr en la que X puede ser un aminoácido excepto prolina.
13. Una proteína de fusión de la reivindicación 12, en la que el sitio de glucosilación ligado a N se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos N413 de SEC ID N°: 3 y N611 de SEC ID N°: 3.
14. Una proteína de fusión de las reivindicaciones 1 o 3, en la que el mTf comprende al menos una sustitución, una delección o una adición de aminoácidos en un resto de aminoácido en SEC ID N°: 3 seleccionado del grupo que consiste en Asp 63, Gly 65, Tyr 95, Tyr 188, Lys 206, His 207, His 249, Asp 392, Tyr 426, Tyr 514, Tyr 517, His 585, Thr 120, Arg 124, Ala 126, Gly 127, Thr 452, Arg 456, Ala 458 y Gly 459.
15. Una proteína de fusión de la reivindicación 2, en la que el resto de prolina C terminal o el bucle de cisteína terminal de mTf están suprimidos.
16. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína mTf muestra glucosilación reducida en comparación con transferrina humana de SEC ID N°: 3, y en la que la semivida en suero de la molécula de GLP-1 aumenta por encima de la semivida en suero de la molécula de GLP-1 en un estado no fusionado.
17. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína mTf tiene un dominio N terminal en cada extremo de la proteína.

18. La proteína de fusión de la reivindicación 17, en la que la molécula de GLP-1 está fusionada con cada dominio N terminal de la proteína mTf.
- 5 19. Una proteína de fusión de la reivindicación 2, en la que se inserta una molécula de GLP-1 en cada uno de los 5 bucles de transferrina.
20. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la molécula de GLP-1 se ha modificado para evitar la escisión de dipeptidilo.
- 10 21. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la molécula de GLP-1 comprende GLP-1 con una o más adiciones o sustituciones de aminoácidos en el extremo N terminal.
22. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la molécula de GLP-1 tiene una modificación química del grupo amino N terminal.
- 15 23. La proteína de fusión de la reivindicación 21, en la que la molécula de GLP-1 está fusionada con proteína transferrina modificada en el extremo N terminal.
- 20 24. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que en la que la molécula de GLP-1 está insertada en el dominio N o el dominio C de la mTf en uno o más de los sitios en SEC ID N°: 3 seleccionados del grupo que consiste en Asp33, Asn55, Asn75, Asp90, Gly257, Lys280, His289, Ser298, Ser105, Glu141, Asp166, Gln184, Asp197, Lys217, Thr231 y Cys241.
- 25 25. Una proteína de fusión de la reivindicación 24, en la que la molécula de GLP-1 está insertada en el dominio N de mTf y está insertada además en la mTf en uno o más sitios en SEC ID N°: 3 seleccionados de Asp33, Asn55, Asn75, Asp90, Gly257, Lys280, His289, Ser298, Ser105, Glu141, Asp166, Gln184, Asp197, Lys217, Thr231 y Cys241.
- 30 26. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la mTf está modificada adicionalmente por delección de la Pro C terminal.
- 30 27. Una proteína de fusión de la reivindicación 26, en la que mTf está modificada adicionalmente por delección de Arg-Arg adyacente a la Pro C terminal.
- 35 28. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la mTf está modificada adicionalmente por eliminación del enlace disulfuro entre Cys402 y Cys674 de SEC ID N°: 3.
29. Una proteína de fusión de las reivindicaciones 26 o 27, en la que la mTf está modificada adicionalmente mutando Cys402 y Cys674 de SEC ID N°: 3 en restos de Gly.
- 40 30. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la molécula de GLP-1 está insertada en uno o más de los bucles en SEC ID N°: 3 seleccionados del grupo que consiste en N<sub>1</sub>(286-292), N<sub>2</sub>(162-170), C<sub>1</sub>(489-495) y C<sub>2</sub>(623-628).
- 45 31. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que la proteína mTf comprende un único dominio N terminal.
32. Una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de GLP-1 es GLP-1(7-37) o GLP-1 (7-36).
- 50 33. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 32, en la que la molécula de GLP-1 es GLP-1(7-37) que consiste en SEC ID N°: 6 o GLP-1 (7-36) que consiste en los aminoácidos 1-30 de SEC ID N°: 6.
34. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 32, en la que la Ala en la segunda posición en SEC ID N°: 6 se ha mutado.
- 55 35. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 34, en la que Ala en la segunda posición en SEC ID N°: 6 se ha mutado a Gly, Ser o Val.
- 60 36. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 60 37. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 36.
38. Una célula hospedadora que comprende un vector de la reivindicación 37.
- 65 39. Una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 36.

40. Un método para expresar una proteína de fusión de mTf que comprende cultivar una célula hospedadora de las reivindicaciones 38 o 39 en condiciones que expresen la proteína de fusión codificada.
- 5 41. Una célula hospedadora de las reivindicaciones 38 o 40, en la que la célula es procariota o eucariota.
42. Una célula hospedadora de la reivindicación 41, en la que la célula es una célula de levadura.
43. Un animal transgénico no humano que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 36.
- 10 44. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 y un vehículo.
45. Un método para producir una proteína de fusión de mTf que comprende aislar una proteína de fusión de un animal transgénico de la reivindicación 43.
- 15 46. Una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 para uso en un método de tratamiento médico.
47. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 46 para tratar un nivel elevado de glucosa en comparación con un sujeto sano.
- 20 48. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 47, en la que el nivel elevado de glucosa se asocia a diabetes.
- 25 49. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 48, en la que la diabetes es diabetes de Tipo II.
50. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 46 para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva.
51. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 46 para tratar la obesidad.
- 30 52. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 46 para regular el nivel de glucosa en un sujeto.

# FIG. 1

Alineamiento de dominios N y C de transferrina para mostrar restos de unión a hierro



□: similitud  
 ▨: identidad

Restos de aminoácidos implicados en la unión a hierro (\*).

Dominio N	Dominio C
Asp 63	Asp 392
Tyr 95	Tyr 426
Tyr 188	Tyr 514
His 249	His 585

Implicado indirectamente en la unión a hierro (†)

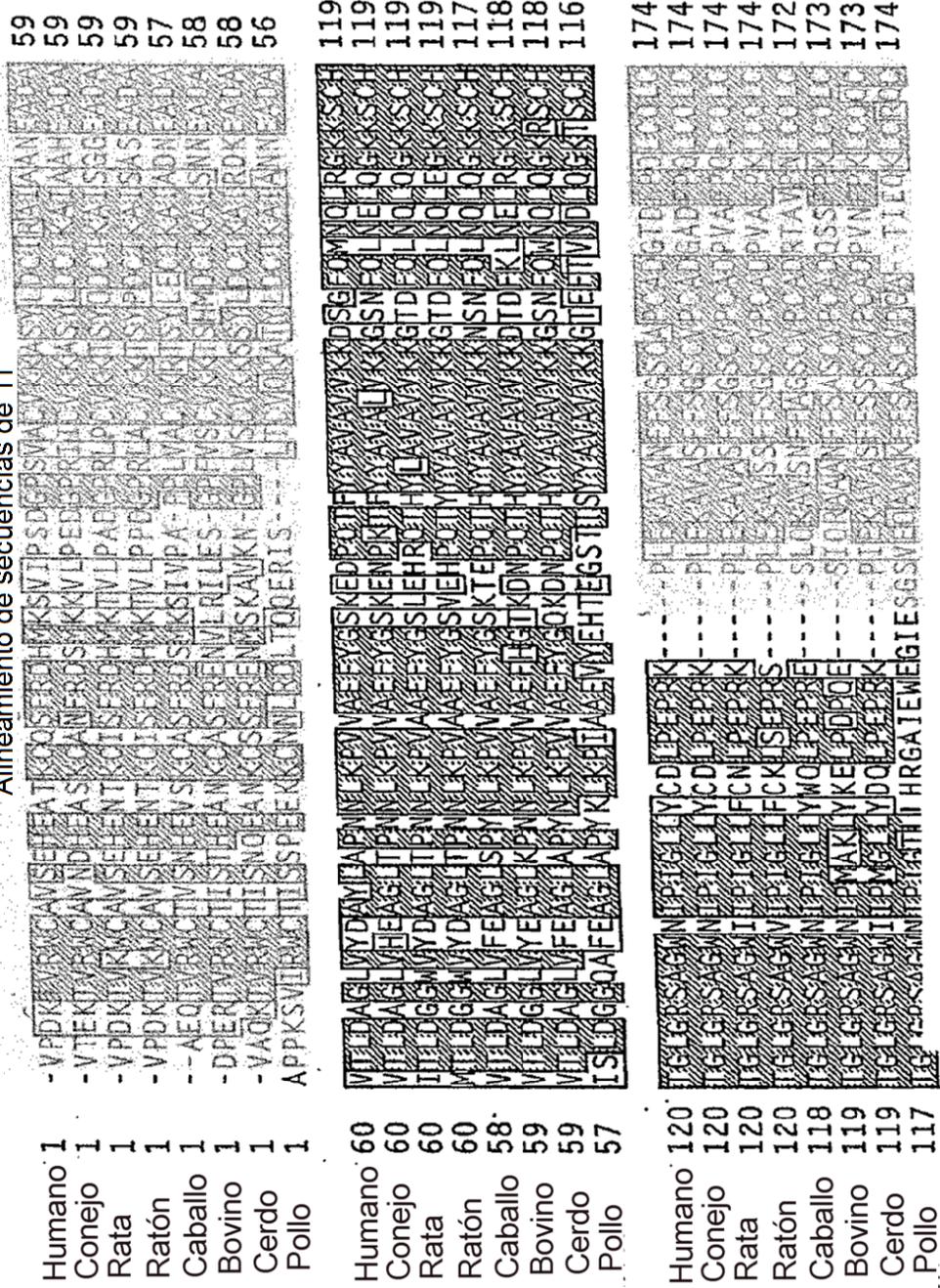
Lys 296	Arg 632
---------	---------

Unión de ión carbonato (‡)

Thr 120	Thr 452
Arg 124	Arg 456
Ala 126	Ala 458
Gly 127	Gly 459

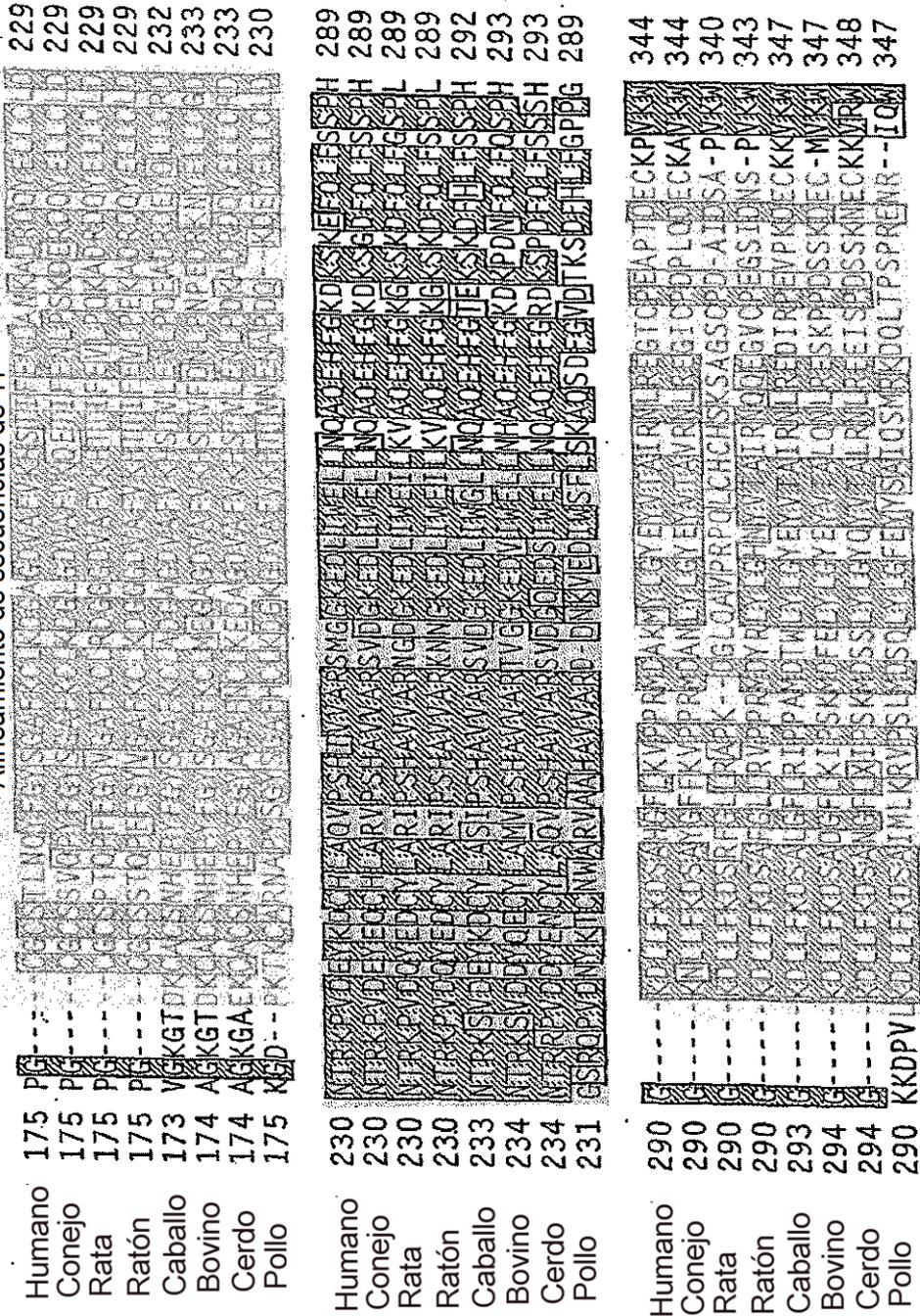
**FIG. 2A-1**

Alineamiento de secuencias de Tf



**FIG. 2A-2**

Alineamiento de secuencias de Tf



**FIG. 3**  
SUMINISTRO DE PEPTIDO USANDO  
TRANSFERRINA RECOMBINANTE

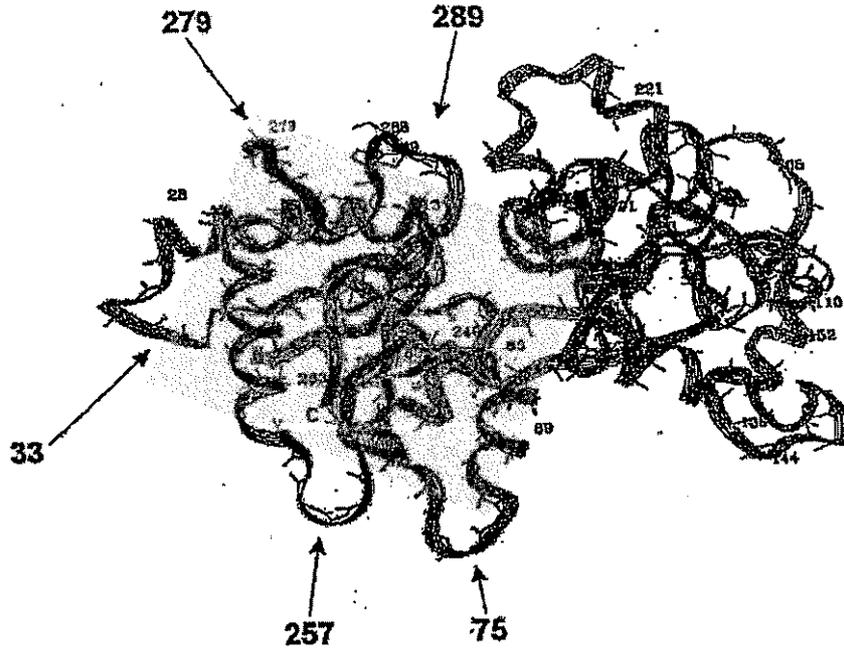


FIG. 2B-1

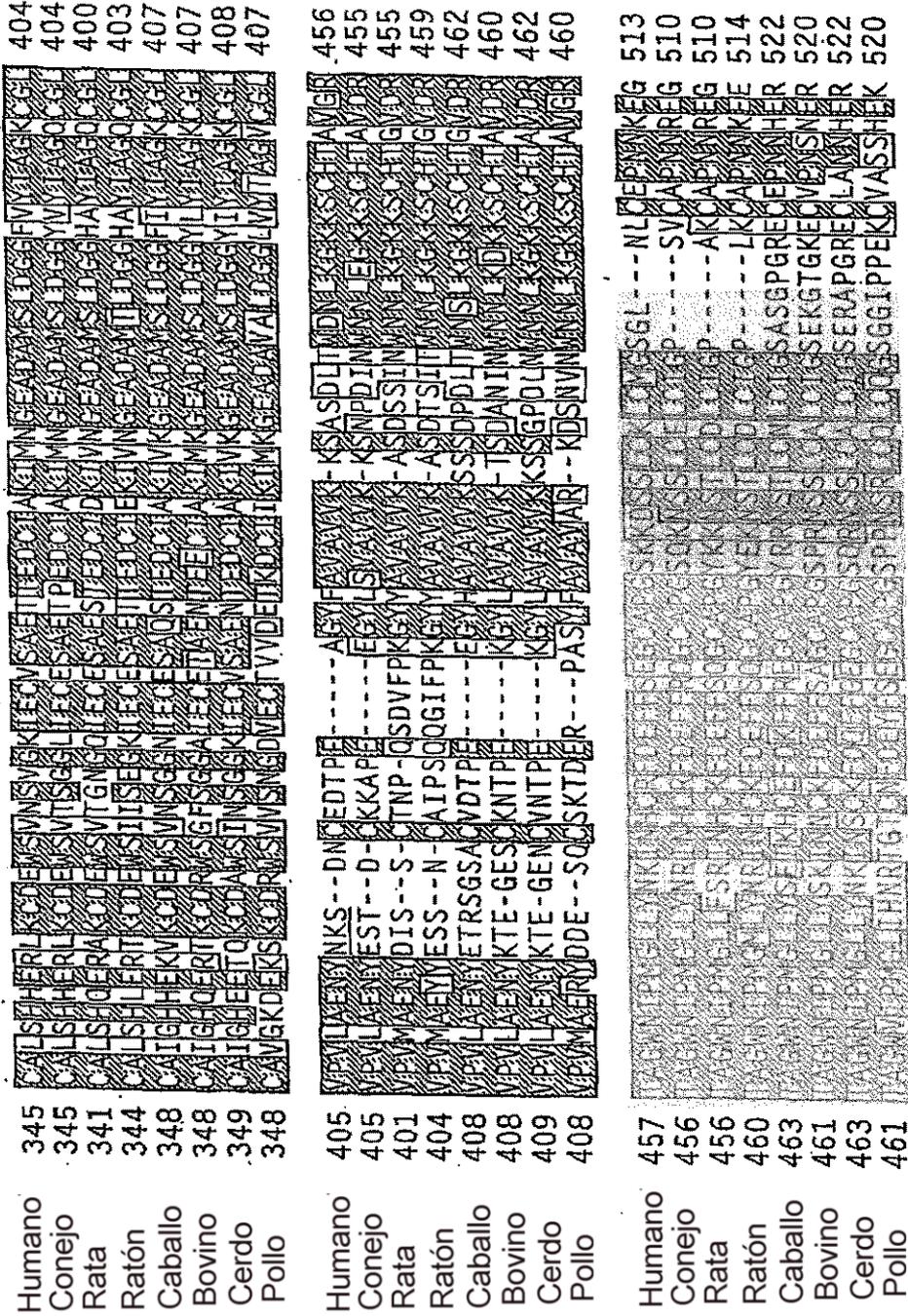
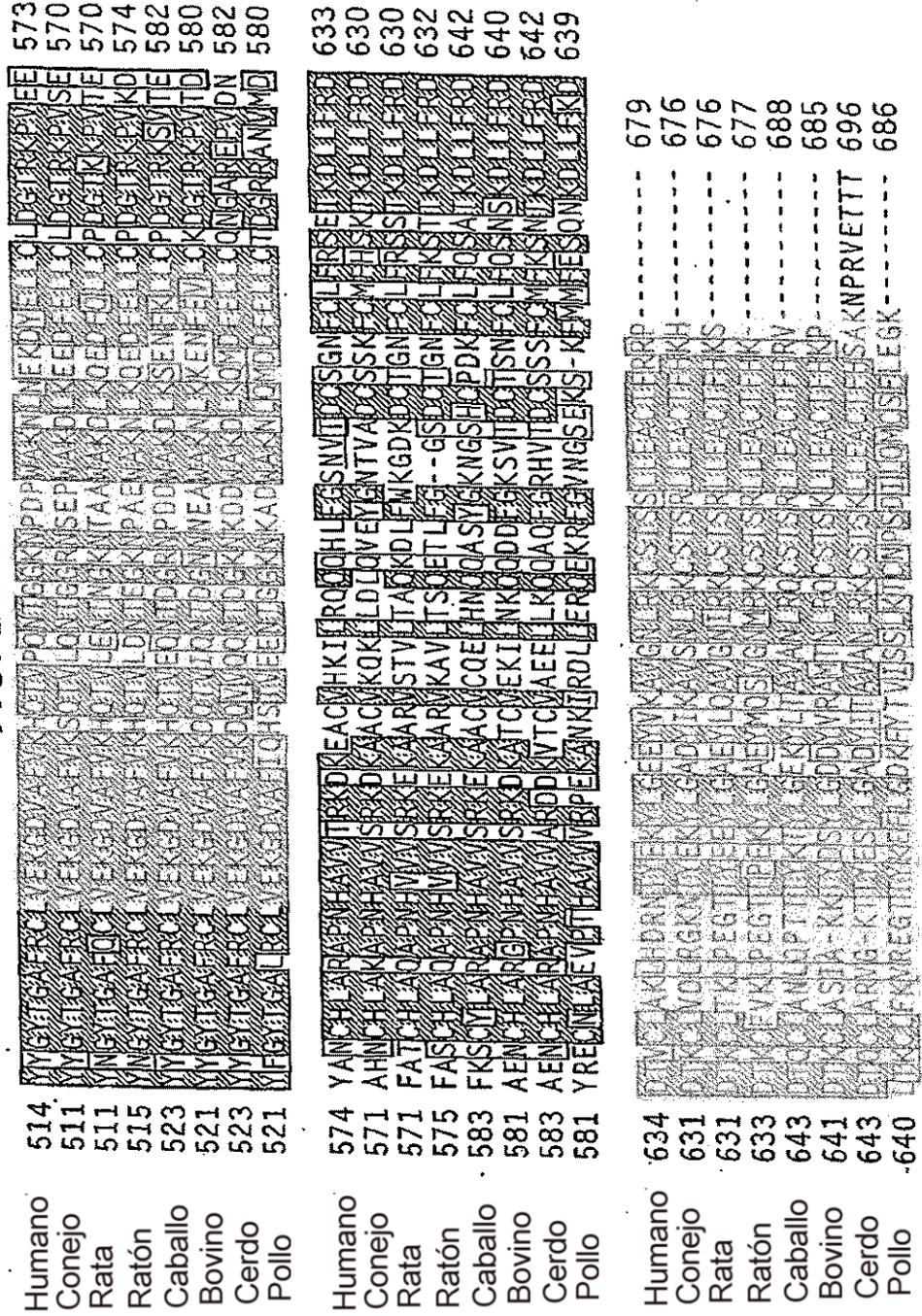


FIG. 2B-2



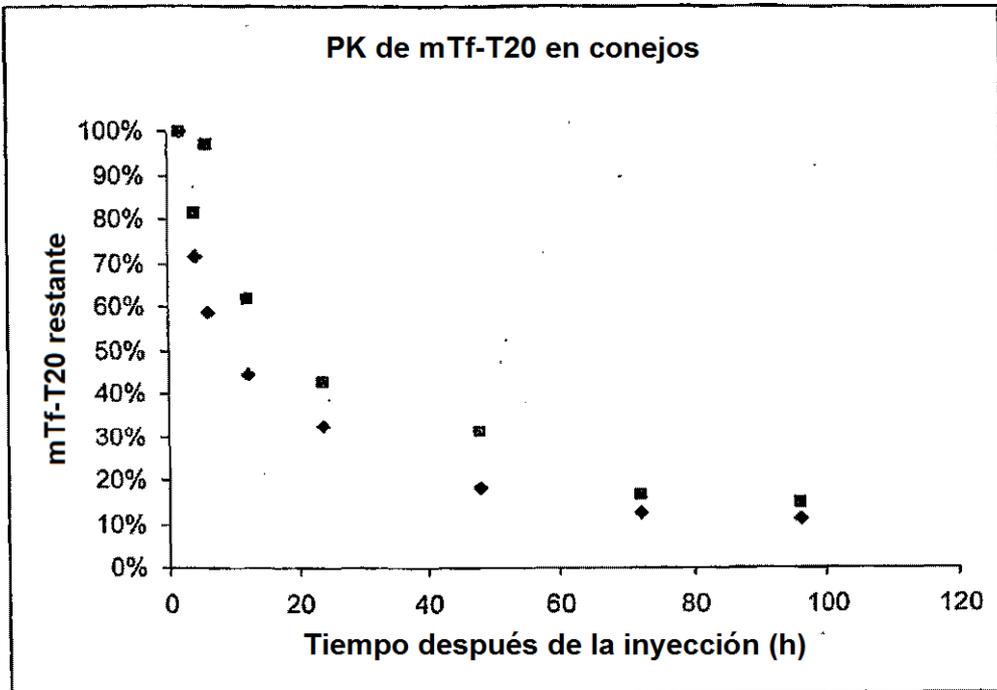


Figura 4