

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 151**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**C07K 14/535** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2011 PCT/CN2011/074678**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11786091 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2576624**

54 Título: **Dímero de G-CSF humano recombinante y uso del mismo para el tratamiento de enfermedades neurológicas**

30 Prioridad:

**25.05.2010 CN 201010181623**

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

**05.05.2017**

73 Titular/es:

**GENERON (SHANGHAI) CORPORATION LTD.  
(100.0%)  
Suite 307, 1011 Ha Lei Road, Z.J. Hi-Tech Park,  
Pudong District  
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**YAN, XIAOQIANG;  
HUANG, ZHIHUA;  
YANG, HONGZHOU;  
SUN, BILL N.C. y  
HUANG, YULIANG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 611 151 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).

**Dímero de G-CSF humano recombinante y uso del mismo para el tratamiento de enfermedades neurológicas****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere al área de las tecnologías biológica y médica, en particular, esta invención se refiere a un nuevo dímero de G-CSF humano y su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con lesión neuronal.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano es una glicoproteína que tiene 204 aminoácidos con 30 péptidos señal de aminoácidos. La proteína de G-CSF madura, teniendo 18-20 kDa de peso molecular, está compuesta de 174 aminoácidos sin péptidos señal y secretada fuera de las células. Las células humanas principalmente responsables de dicha secreción son monocitos, fibroblastos y células endoteliales.

15

Hay tres funciones biológicas principales para el G-CSF, concretamente:

20

1. actuar en los precursores mieloides y células madres para impulsar la diferenciación, desarrollo, y maduración de neutrófilos;
2. activar los neutrófilos maduros para que participen la respuesta inmune; y
3. actuar con otros factores de crecimiento hematopoyéticos como el factor de células madre, ligando Flt-3, y GM-CSF para movilizar las células madres hematopoyéticas.

25

Se ha demostrado que el receptor de G-CSF (G-CSFR) existe en células madre hematopoyéticas de médula ósea Sca<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>Thl<sup>-</sup>, células precursoras CD34<sup>+</sup>, células precursoras de granulocitos dedicadas, y neutrófilos maduros. El G-CSFR es un receptor específico que tiene una alta afinidad con el G-CSF y 812 aminoácidos.

30

Tamada et al. obtuvo la estructura cristalina del complejo G-CSF:G-CSFR y la estequiometría del complejo G-CSF:G-CSFR se mostró como una proporción 2:2 por el análisis de difracción de 2,8 angstrom (PNAS, 2008, Vol. 103: 3135-3140). En otras palabras, en cada complejo, cada G-CSF enlaza con una cadena receptora para formar un complejo receptor de G-CSF cuando dos complejos receptores de G-CSF se llevan a proximidad cercana, se forma un dímero 2:2 como resultado de esta interacción. Bajo esta circunstancia, el carboxilo terminal del receptor de G-CSF es entonces capaz de activar las JAKs (tirosinas quinasas Janus, principalmente JAK2) de las moléculas de la señal descendente. Consecuentemente la JAK2 conecta el STAT3 para activar los genes de transcripción que son críticos para la diferenciación y proliferación y activación de neutrófilos.

35

En el 2003, Schabitz W. R. et al. informó que el G-CSF recombinante humano (rhG-CSF) mostró tener una funcionalidad protectora en las células nerviosas del estudio en el modelo animal isquémico (Storke, 2003, 34:745-751). Posteriormente en el 2006, Shyu et al. informó que el rhG-CSF demostró tener eficacia clínica en el tratamiento de pacientes que tenían apoplejía aguda en el que a los pacientes se les administró rhG-CSF diariamente durante cinco días consecutivos (CMAJ, 2006, 174:927-933). La vida medio in vivo de G-CSF de rata tras la administración subcutánea es de solamente 3,5 horas. Por lo tanto, se requiere administrar a pacientes con necesidad de ello con el fármaco diariamente, o por infusión intravenosa y esto afectara a la calidad de vida de los pacientes.

40

45

Varios documentos en el estado de la técnica divulgan dímeros de G-CSF. La US 6.797.493 B2 divulga proteínas de fusión Fc del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano con actividades biológicas aumentadas. En algunos casos el compañero de fusión es una parte de Fc de IgG2 y los conectores incluyen péptido y conectores flexibles. La proteína de fusión prototipo es una proteína homodimérica ligada a través de residuos de cisteína a la región bisagra de Fc de IgG, resultando en una molécula similar a una molécula de IgG sin los dominios CHI y las cadenas ligeras. La WO02/36626 divulga dímeros de G-CSF ligados directamente con un enlace peptídico y mutantes de los mismos. Dichos péptidos de G-CSF diméricos tienen depuración reducida y vidas medias aumentadas. Cox G. N. et al en 2004 ("Enhanced circulating half-life and hematopoietic properties of a human granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin fusion protein", Experimental Hematology, 32: 441-449) divulgó la vida media de circulación aumentada y las propiedades hematopoyéticas de un factor estimulante de colonias de granulocitos humano/proteína de fusión de inmunoglobulina. La US 2008/300188 A1 divulga G-CSF humano fusionado con Fc. Las proteínas de fusión de IgG-Fc e IgG-CG se sintetizan como monómeros que pueden ensamblarse para formar dímeros; los dímeros se unen por enlaces de disulfuro en la región bisagra de IgG. Las proteínas pueden unirse a la parte de Fc por un conector, incluyendo conectores flexibles compuestos de residuos Ser y Gly o conectores de albúmina. La WO 01/03737 divulga proteínas de fusión de G-CSF con Fc, preferiblemente de IgG1 o IgG4. Las proteínas de fusión de IgG de G-CSF pueden estimular un aumento acelerado en los niveles de neutrófilos circulantes y granulopoyesis en ratones. Pueden usarse conectores péptidos como SerGly. La WO 03/076567 divulga proteínas de fusión de G-CSF heterólogas que pueden fusionarse directamente o por un conector péptido con albúmina o un análogo, fragmento o derivado del mismo. También se divulgan las proteínas de fusión

50

55

60

65

5 heterólogas de G-CSF:Fc, incluyendo con Fc de IgG1 e IgG4. El conector es preferiblemente un conector péptido incluyendo péptidos ricos en glicina, (GGGGS)<sub>n</sub>, donde n es de 1 a 5. La EP2612676 divulga dímeros de G-CSF, algunos de los cuales a través de G-CFS-Fc formado por el acoplamiento de los fragmentos Fc presentes en Iso dos monómeros de G-CSF. También se divulgan fusiones de dos monómeros de G-CSF a través de albúmina. Se reivindican los usos de los mismos para tratar neutropenia.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

10 A la luz de los antecedentes anteriores, es un objeto de la presente invención proporcionar un fármaco alternativo para el tratamiento de enfermedades asociadas con lesión neuronal con eficacia mejorada y la fabricación de los mismos.

15 La invención proporciona un dímero del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano de fórmula (I)



en la que

20 M1 es un primer monómero de G-CSF;  
M2 es un segundo monómero de G-CSF; y  
L es un conector que conecta dicho primer monómero y dicho segundo monómero y está dispuesto entre ellos;  
en donde L es un polipéptido de fórmula (II):



en la que

30 Y es una proteína portadora formada por dos fragmentos Fc conectados a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; y  
Z es un péptido corto que comprende de 0 a 30 aminoácidos;

35 en la que dicho dímero de G-CSF retiene la actividad biológica del G-CSF y se produce por dos complejos G-CSF-Fc, cada uno de dichos complejos G-CSF-Fc comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

La invención también proporciona un dímero del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano de fórmula (I)



en la que

45 M1 es un primer monómero de G-CSF;  
M2 es un segundo monómero de G-CSF; y  
L es un conector que conecta dicho primer monómero y dicho segundo monómero y está dispuesto entre ellos;  
en donde L es un polipéptido de fórmula (II):



en la que

55 Y es una proteína portadora formada por dos fragmentos Fc conectados a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; y  
Z es un péptido corto que comprende de 0 a 30 aminoácidos;

60 en la que dicho dímero de G-CSF retiene la actividad biológica del G-CSF y se produce por dos complejos G-CSF-Fc, cada uno de dichos complejos G-CSF-Fc comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 para su uso en un método para tratar un trastorno neurológico.

La invención también proporciona un método para la fabricación de un dímero del G-CSF-Fc de fórmula (I)



en la que

M1 es un primer monómero de G-CSF;

M2 es un segundo monómero de G-CSF; y

5 L es un conector que conecta dicho primer monómero y dicho segundo monómero y está dispuesto entre ellos;

en donde L es un polipéptido de fórmula (II):

(II) -Z-Y-Z

10 en la que

Y es una proteína portadora formada por dos fragmentos Fc conectados a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; y

Z es un péptido corto que comprende de 0 a 30 aminoácidos;

15 en la que dicho dímero de G-CSF retiene la actividad biológica del G-CSF y se produce por dos complejos G-CSF-Fc, cada uno de dichos complejos G-CSF-Fc comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 que comprende los pasos de:

20 a) transformar células mamíferas con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica un complejo G-CSF-Fc que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10;

b) cultivar dichas células mamíferas transformadas bajo condiciones suficientes para expresar dicho complejo G-CSF-Fc y dicho dímero; y

25 c) aislar y purificar dicho dímero obtenido del paso (b);

en la que dicho dímero comprende los dos complejos G-CSF-Fc mencionados, cada uno de dichos complejos G-CSF-Fc comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

También se divulga, en un aspecto, un dímero de G-CSF de fórmula (I):

30 (I) M1-L-M2

en la que M1 es un primer monómero de G-CSF; M2 es un segundo monómero de G-CSF; y L es un conector que conecta dicho primer monómero y dicho segundo monómero y está dispuesto entre ellos.

35 También, el dímero de G-CSF retiene la actividad biológica del monómero de G-CSF y tiene una vida media en suero de más del doble de la de los mencionados primer o segundo monómero.

En una realización ejemplar de la presente divulgación, la L se selecciona del grupo consistente de:

40 a). un conector orgánico;  
b). un péptido corto que comprende de 3 a 50 aminoácidos; y  
c). un polipéptido de fórmula (II):

45 (II) -Z-Y-Z-

en la que Y es una proteína portadora; Z es un péptido corto que comprende de 0 a 30 aminoácidos. En una realización ejemplar, el péptido corto sin cualquiera de los aminoácidos se refiere a un enlace peptídico.

50 En otro dímero de G-CSF tal que el pliegue apropiado y la conformación formaron una realización ejemplar, el conector tiene suficiente poco impedimento estérico por la configuración del primer monómero y el segundo monómero no se ve afectado o significativamente afectado.

55 En una realización ejemplar, el conector orgánico se selecciona del grupo consistente de resina de oximetilfenilacetamidometilo (PAM), resina de 4-oximetil fenilacetamidometilo, y resina de clorometil poliestireno.

En otra realización ejemplar, el primer monómero y el segundo monómero son de la misma entidad.

60 En una realización ejemplar, la actividad biológica de la proteína de fusión incluye:

a). actuar en los granulocitos de neutrófilos y célula madre para impulsar la diferenciación, crecimiento y maduración de neutrófilos; y  
b). activar neutrófilos maduros para participar en la respuesta inmune.

65 En otra realización ejemplar, la proteína portadora es albúmina o fragmento Fc de IgG humana.

En otra realización ejemplar, la vida media del suero del dímero de G-CSF es más de tres, cinco o diez veces la del primer y/o el segundo monómero.

5 En otra realización ejemplar, el dímero de G-CSF se produce por dos complejos G-CSF-Fc en el que cada complejo G-CSF-Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 2-5 ó 7. En la invención cada complejo G-CSF-Fc comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.

10 En otro aspecto de la presente divulgación, se divulga una proteína de fusión hecha de un primer polipéptido y un segundo polipéptido en la que el primer y el segundo polipéptidos comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, y los dos polipéptidos están ligados entre sí sin impedimento estérico.

En una realización ejemplar, el primer y el segundo polipéptidos son monómeros de G-CSF.

15 En otra realización ejemplar de la presente divulgación, el ligamiento sin impedimento entre el mencionado primer polipéptido y el segundo polipéptido se lleva a cabo por un conector. En esta realización, el conector es:

- 20 a). un conector orgánico con suficientemente poco impedimento estérico para no afectar o afectar significativamente el pliegue apropiado y la conformación formada por la configuración de dicho primer monómero y dicho segundo monómero;
- b). un péptido corto que comprende de 3 a 50 aminoácidos; y
- c). un polipéptido de fórmula (II):

25 (II) -Z-Y-Z-

en la que Y es una proteína portadora; Z es un péptido corto que comprende de 0 a 30 aminoácidos. En una realización ejemplar, el péptido corto sin ningún aminoácido se refiere a un enlace peptídico.

30 En una realización ejemplar, el conector orgánico es: resina de oximetilfenilacetamidometilo (PAM), resina de 4-oximetil fenilacetamidometilo, y resina de clorometil poliestireno.

35 En otro aspecto de la presente divulgación, se divulga una composición farmacéutica que comprende como su ingrediente activo, un dímero de G-CSF purificado producido por dos complejos G-CSF-Fc en el que cada complejo G-CSF-Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de las SEQ ID NOs: 2-5 ó 7. Las composiciones de la invención se definen en la reivindicación 3. En una realización ejemplar de la invención, el dímero G-CSF tiene una pureza del 90-100%; en otra realización ejemplar, el dímero de G-CSF tiene una pureza del 95-100%; en otra realización ejemplar, el dímero de G-CSF tiene una pureza del 99-100%.

40 En una realización ejemplar en este aspecto específico, un método para tratar un trastorno neurológico que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición farmacéutica anteriormente mencionada a un sujeto con necesidad del tratamiento. En una realización ejemplar, la cantidad efectiva varía de 0,001-1.000 mg del dímero por dosis. En otra realización ejemplar, la enfermedad se selecciona del grupo consistente de: apoplejía, lesión de médula, y trastornos neurológicos acompañados con lesión de la barrera hematoencefálica.

45 En otra realización ejemplar en este aspecto específico, un método para activar el STAT3 en células neuronales que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición farmacéutica anteriormente mencionada a un sujeto con necesidad del tratamiento. En una realización ejemplar, la cantidad efectiva varía de 0,001-1.000 mg del dímero por dosis.

50 En otros aspecto se divulga un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 2-7. En otra realización, se divulga una composición farmacéutica que comprende como su ingrediente activo, un polipéptido purificado que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs: 2-7. En una realización ejemplar, el polipéptido tiene una pureza del 90-100%; en otra realización ejemplar, el polipéptido tiene una pureza del 95-100%; en otra realización ejemplar, el polipéptido tiene una pureza del 99-100%.

55 En una realización ejemplar en este aspecto específico, un método para tratar un trastorno neurológico que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición farmacéutica anteriormente mencionada a un sujeto con necesidad del tratamiento. En otra realización ejemplar, la enfermedad se selecciona del grupo consistente de apoplejía, lesión de médula y trastornos neurológicos acompañados con lesión de la barrera hematoencefálica.

60 En otra realización ejemplar en este aspecto específico, un método de activar el STAT3 en células neuronales que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición farmacéutica anteriormente mencionada a un sujeto con necesidad del tratamiento.

65 En otro aspecto de esta invención, se divulga un uso de un dímero del factor estimulante de colonias de

granulocitos (G-CSF) humano o el polipéptido asociado de la invención en la preparación de la medicina para tratar un trastorno neurológico.

5 En una realización ejemplar en este aspecto específico, la enfermedad se selecciona del grupo consistente de apoplejía, lesión de médula y trastornos neurológicos acompañados con lesión de la barrera hematoencefálica.

10 En otro aspecto de esta invención, se divulga un uso del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano o el polipéptido asociado de la invención en la preparación de la composición para activar el STAT 3 en células neuronales.

En otro aspecto de esta invención, se divulga un método para la fabricación de un dímero de G-CSF que comprende los pasos de :

15 a). transformar células mamíferas con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica un complejo G-CSF-Fc que comprende la secuencia de nucleótidos de un grupo que consiste de la SEQ ID NO: 9-10;

b). cultivar las células mamíferas transformadas bajo condiciones suficientes para expresar los complejos G-CSF-Fc y los dímeros de G-CSF; y

20 aislar y purificar el dímero de G-CSF obtenido del paso (b);  
en el que el dímero de G-CSF comprende dos complejos G-CSF-Fc en los que cada complejo G-CSF-Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo consistente de las SEQ ID NOs: 2-7.

25 En otro aspecto de esta invención, se divulga un método para la fabricación de un polipéptido aislado que comprende los pasos de:

a). transformar células mamíferas con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica el polipéptido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que consiste de las SEQ ID NO: 9-10;

30 b). cultivar las células mamíferas transformadas bajo condiciones suficientes para expresar el polipéptido; y  
aislar y purificar el polipéptido obtenido del paso (b);

en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo consistente de las SEQ ID NOs: 2-7.

#### 35 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es una ilustración de la estructura del dímero de G-CSF con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:1 de acuerdo con una realización de la presente divulgación. En la figura, "-" representa el conector y el objeto con forma de óvalo etiquetado con "G-CSF" representa un monómero de G-CSF.

40 En esta realización específica, el dímero de G-CSF tiene un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 1-174) conectado a otro monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 191-364) por un conector (residuos de aminoácidos 175-190).

45 La Fig. 2a es una ilustración de la estructura de un dímero de G-CSF de acuerdo con una realización de la presente divulgación.

50 La Fig. 2b es una ilustración de la estructura de un dímero de G-CSF de acuerdo con una realización de la presente invención. En la figura, "-" representa el conector y el objeto con forma de óvalo etiquetado con "G-CSF" representa un monómero de G-CSF. El objeto con forma de óvalo etiquetado con "C" representa una proteína portadora en la que el monómero de G-CSF está dispuesta en el N-terminal de la proteína portadora. El objeto con forma de óvalo etiquetado con "Fc" representa un fragmento Fc de la IgG2 humana.

55 Las Figs. 3a y 3b son ilustraciones de la estructura del dímero de G-CSF con aminoácidos de acuerdo con una realización de la presente divulgación. En la figura, "-" representa el conector y el objeto con forma de óvalo etiquetado con "G-CSF" representa un monómero de G-CSF. El objeto con forma de óvalo etiquetado con "C" representa una proteína portadora en la que el monómero de G-CSF está dispuesta en el N-terminal de la proteína portadora. El objeto con forma de óvalo etiquetado con "Fc" representa un fragmento Fc de la IgG2 humana.

60 Las Figs. 4, 6 muestran la eficacia clínica del dímero de G-CSF de acuerdo con una realización de la presente invención del estudio del modelo animal de isquemia cerebral focal.

65 La Fig. 5 muestra la eficacia de activar el STAT3 in vitro por el dímero de G-CSF de acuerdo con una realización de la presente invención.

**DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS**

Tras una investigación extensa y exhaustiva, los inventores han creado con éxito un nuevo dímero de G-CSF como se describe en la presente. Este nuevo dímero de G-CSF demuestra prolongar in vivo la vida media del mismo, mejorar las propiedades farmacocinéticas del fármaco del mismo, reducir la frecuencia de administración del fármaco, potenciar la actividad del fármaco in vivo y promover la rehabilitación de la recuperación de la función neurológica. El dímero de G-CSF también demuestra exhibir activación de STAT3 significativa en comparación con el monómero de G-CSF a igual proporción molar de G-CSF, por lo tanto potenciar la bioactividad del fármaco del mismo, mejorar el resultado terapéutico de lesiones neuronales. Las características anteriormente mencionadas se describirán adicionalmente en los ejemplos siguientes.

**Dímero de G-CSF**

Una realización de la presente invención es un dímero del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano de fórmula (I)

(I) M1-L-M2  
en la que

M1 es un primer monómero de G-CSF;  
M2 es un segundo monómero de G-CSF; y  
L es un conector que conecta dicho primer monómero y dicho segundo monómero y está dispuesto entre ellos;  
en donde L es un polipéptido de fórmula (II):

(II) -Z-Y-Z  
en la que

Y es una proteína portadora formada por dos fragmentos Fc conectados a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; y  
Z es un péptido corto que comprende de 0 a 30 aminoácidos;

en la que dicho dímero de G-CSF retiene la actividad biológica del G-CSF y se produce por dos complejos G-CSF-Fc, cada uno de dichos complejos G-CSF-Fc comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

Otra realización de la presente divulgación es un dímero de G-CSF representado por la fórmula (I) anteriormente mencionada y la ilustración estructural del mismo se muestra en las Figs. 1-3. La proteína portadora comprende fragmento Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas, y albúmina humana.

En una realización preferida, el G-CSF puede estar dispuesto en el C-terminal o el N-terminal de la proteína portadora como se muestra en las Figs. 2-3.

Como se usa en la presente y en las reivindicaciones, "conector" se refiere a una molécula que es capaz de conectar dos polipéptidos de los monómeros juntos de tal manera que el compuesto resultante mantiene la actividad biológica o tiene actividad biológica mejorada del polipéptido de los monómeros.

En una realización preferida, "conector" se refiere a un conector orgánico o una secuencia de aminoácidos enlazados por péptidos que une o conecta por enlaces peptídicos dos aminoácidos que une conecta por enlaces peptídicos dos secuencias de aminoácidos o dominios de polipéptidos que no están unidos por enlaces peptídicos en la naturaleza. Una secuencia conectora está codificada en marco en un polinucleótido entre las secuencias que codifican los dos dominios de polipéptidos unidos por el conector.

En otra realización preferida, "conector" también puede referirse a un péptido corto que conecta los dos monómeros de G-CSF intercalando el péptido corto. No hay ninguna restricción especial en la longitud del conector. Un conector es habitualmente de 5-50 residuos de aminoácidos de longitud y en general, un conector no afecta o afecta significativamente al pliegue apropiado y la conformación formada por la configuración de los dos monómeros de G-CSF.

Una lista de ejemplos de conectores incluye: un conector orgánico, un péptido corto que comprende de 3-50 aminoácidos, y un polipéptido representado por la fórmula (II) anteriormente mencionada.

En una realización preferida, el conector orgánico puede ser resina de oximetilfenilacetamidometilo (PAM), resina de 4-oximetil fenilacetamidometilo, resina de clorometil poliestireno o cualquier combinación de los mismos con suficientemente poco impedimento estérico para no afectar o afectar significativamente al pliegue apropiado y la conformación formada por la configuración de los dos monómeros de G-CSF.

En otra realización preferida, el conector comprende aminoácidos con una conformación estructural relativamente pequeña para no afectar o afectar significativamente al pliegue apropiado y la conformación formada por la configuración de los dos monómeros de G-CSF, como glicina, alanina, prolina, etc.

5 En otra realización preferida, el conector contiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente de:

- 10 (a). una secuencia de aminoácidos con 3-15 residuos de aminoácidos formados por glicina (Gly) o prolina (Pro) de aminoácidos hidrófobos, como Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro;
- (b). una secuencia de aminoácidos codificada por múltiples sitios de clonación. Dicha secuencia habitualmente contiene 5-20 residuos de aminoácidos; en una realización preferida, dicha secuencia contiene 10-20 residuos de aminoácidos;
- 15 (c). una secuencia de aminoácidos que comprende proteínas no del monómero de G-CSF, como una secuencia de aminoácidos de IgG o albúmina;
- (d). una secuencia de aminoácidos que comprende cualquier combinación de las (a), (b) y (c) anteriores.

20 En una realización preferida, el conector tiene la secuencia de GSGGSGGGGSGGGGS (es decir, 175-190 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:1). En otra realización preferida, el conector tiene la secuencia de ASTKGP (es decir, 175-180 residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:4).

25 En una realización preferida adicional, una secuencia de aminoácidos que no afecta a la actividad biológica del monómero de G-CSF puede añadirse al N-terminal o C-terminal del dímero de G-CSF. En una realización preferida, dicha secuencia de aminoácidos añadida es beneficiosa para la expresión (por ejemplo péptido señal), purificación (por ejemplo secuencia 6 x His, el sitio de escisión del péptido señal del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*), o mejora de la actividad biológica del dímero G-CSF.

#### Listado de Secuencias

30 La SEQ ID NO:1 representa un dímero de G-CSF como se muestra en la Fig. 1 que comprende un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 1-174) conectado a otro monómero (residuos de aminoácidos 191-364) por un conector (residuos de aminoácidos 175-190).

35 La SEQ ID NO:2 representa un complejo G-CSF-Fc como componente para hacer el dímero G-CSF como se muestra en las Figs. 2a y 2b que comprende un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 1-174), un fragmento Fc de IgG2 humana (residuos de aminoácidos 191-418), y un péptido que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento Fc (residuos de aminoácidos 175-190). El dímero se forma a través del emparejamiento de los fragmentos Fc contenidos en cada uno de los dos complejos G-CSF-Fc. En una realización, los fragmentos Fc se emparejan a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; en otra realización, el número de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos es 2 ó 4.

40 La SEQ ID NO:3 representa un complejo G-CSF-Fc como componente para hacer el dímero G-CSF como se muestra en las Figs. 3a y 3b, que comprende un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 245-418), un fragmento Fc de IgG2 humana (residuos de aminoácidos 1-228), y un péptido que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento Fc (residuos de aminoácidos 229-244). El dímero se forma a través del emparejamiento de los fragmentos Fc contenidos en cada uno de los dos complejos G-CSF-Fc. En una realización, los fragmentos Fc se emparejan a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; en otra realización, el número de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos es 2 ó 4.

50 La SEQ ID NO:4 representa un complejo G-CSF-Fc como componente para hacer el dímero de G-CSF como se muestra en las Figs. 2a y 2b que comprende un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 1-174), un fragmento Fc de IgG2 humana (residuos de aminoácidos 181-403) y un péptido que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento Fc (residuos de aminoácidos 175-180). Al comparar con la SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:4 tiene un péptido más corto que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento Fc (con diez residuos de aminoácidos menos). También se elimina una secuencia corta de ERKCC en la SEQ ID NO:4, por lo que dos enlaces de disulfuro se eliminan para dar como resultado la reducción de posibilidad de falta de coincidencia de la bisagra. El dímero se forma a través del emparejamiento de los fragmentos Fc contenidos en cada uno de los dos complejos G-CSF-Fc. En una realización, los fragmentos Fc se emparejan a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; en otra realización el número de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos es 2 ó 4.

60 La SEQ ID NO:5 representa un complejo G-CSF-Fc como componente para hacer el dímero de G-CSF como se muestra en las Figs. 3a y 3b que comprende un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 230-403), un fragmento Fc de IgG2 humana (residuos de aminoácidos 1-223) y un péptido que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento Fc (residuos de aminoácidos 224-229). Al comparar con la SEQ ID NO:3, la SEQ ID NO:5 tiene un péptido más corto que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento

65

5 Fc (con diez residuos de aminoácidos menos). También se elimina una secuencia corta de ERKCC en la SEQ ID NO:5, por lo que dos enlaces de disulfuro se eliminan para dar como resultado la reducción de posibilidad de falta de coincidencia de la bisagra. El dímero se forma a través del emparejamiento de los fragmentos Fc contenidos en cada uno de los dos complejos G-CSF-Fc. En una realización, los fragmentos Fc se emparejan a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; en otra realización el número de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos es 2 ó 4.

10 La SEQ ID NO:6 representa un complejo G-CSF-Fc como componente para hacer el dímero de G-CSF como se muestra en las Figs. 2a y 2b que comprende un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 1-174), un fragmento Fc de IgG2 humana (residuos de aminoácidos 191-413) y un péptido que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento Fc (residuos de aminoácidos 175-190). Al comparar con la SEQ ID NO:2, se elimina una secuencia corta ERKCC en la SEQ ID NO:6, por lo que dos enlaces de disulfuro se eliminan para dar como resultado la reducción de posibilidad de falta de coincidencia de la bisagra. El dímero se forma a través del emparejamiento de los fragmentos Fc contenidos en cada uno de los dos complejos G-CSF-Fc. En una realización, los fragmentos Fc se emparejan a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; en otra realización el número de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos es 2 ó 4.

20 La SEQ ID NO:7 representa un complejo G-CSF-Fc como componente para hacer el dímero de G-CSF como se muestra en las Figs. 3a y 3b que comprende un monómero de G-CSF (residuos de aminoácidos 240-413), un fragmento Fc de IgG2 humana (residuos de aminoácidos 1-223) y un péptido que conecta dicho monómero de G-CSF y dicho fragmento Fc (residuos de aminoácidos 224-239). Al comparar con la SEQ ID NO:3, se elimina una secuencia corta ERKCC en la SEQ ID NO:7, por lo que dos enlaces de disulfuro se eliminan para dar como resultado la reducción de posibilidad de falta de coincidencia de la bisagra. El dímero se forma a través del emparejamiento de los fragmentos Fc contenidos en cada uno de los dos complejos G-CSF-Fc. En una realización, los fragmentos Fc se emparejan a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; en otra realización el número de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos es 2 ó 4.

30 La SEQ ID NO:8 representa una molécula del monómero de G-CSF.

La SEQ ID NO:9 representa las secuencias de ADN de la SEQ ID NO:2.

35 La SEQ ID NO:10 representa las secuencias de ADN de la SEQ ID NO:6.

#### Método de Preparación

40 La codificación de las secuencias de ADN del dímero de G-CSF o proteína de fusión de la presente invención puede sintetizarse artificialmente completamente. Alternativamente, las secuencias de ADN codificadas del primer monómero de G-CSF y/o el segundo monómero de G-CSF pueden obtenerse por amplificación o síntesis por PCR y unirse entre sí para formar la secuencia de ADN codificada del dímero de G-CSF o proteína de fusión de la presente invención.

45 Para mejorar el volumen de expresión de las células huésped, pueden realizarse modificaciones en la secuencia codificada del dímero de G-CSF. Por ejemplo, puede usarse desplazamiento de codón de las células huésped para eliminar secuencias que nos son beneficiosas para la transcripción y la traslación. En una realización preferida, puede usarse el desplazamiento de codón de células de levadura o células mamíferas junto con el software de ADN para detectar genes del dímero del ADN, para eliminar secuencias que no son beneficiosas para la transcripción y la traslación. En una realización preferida, las secuencias eliminadas pueden ser sitio de corte de intrones, secuencia de terminación de transcripción, etc.

50 Después de que se obtiene la secuencia de ADN codificada de la nueva proteína de fusión de la presente invención, se inserta primero en un portador de expresión apropiado, seguido por una célula huésped apropiada. Finalmente, la célula huésped transformada se cultiva y purifica para obtener la nueva proteína de fusión de la presente invención. Las secuencias de ADN de la SEQ ID NO:2 y 6 se muestran en las SEQ ID NO:9 y 10 respectivamente.

60 Como se usa en la presente y en las reivindicaciones, "portador" se refiere a plásmido, cósmido, vehículo de expresión, vector de clonación, vector virus, etc.

65 En esta invención, se pueden usar portadores conocidos en la técnica, como portadores disponibles en el mercado. Por ejemplo, con el uso de portador obtenido del mercado, la secuencia de nucleótidos codificada de la nueva proteína de fusión de la presente invención se conecta operacionalmente con la secuencia de expresión y control para formar el portador que expresa la proteína.

5 Como se usa en la presente y en las reivindicaciones, "operacionalmente conectado" se refiere a un escenario en el que algunas partes de una secuencia de ADN lineal puede afectar a la actividad biológica de otras partes de la misma secuencia de ADN lineal. Por ejemplo, si el ADN señal se usa como la expresión de un precursor y participa en la secreción de polipéptidos, dicho ADN señal (secuencia líder de secreción) está "conectado operacionalmente" a dichos polipéptidos. Si un promotor controla la transcripción de secuencia, el promotor está "operacionalmente conectado" a la secuencia codificada. Si un sitio de enlace de ribosomas está situado en una posición en la que se hace posible la traslación de los mismos, dicho sitio de enlace de ribosomas está "operacionalmente conectado" con la secuencia codificada. En general, "operacionalmente conectado" significa que los residuos del asunto están en proximidad; para la secuencia líder de secreción, "operacionalmente conectado" se refiere a proximidad dentro del marco de lectura.

15 Como se usa en la presente y en las reivindicaciones, "células huésped" se refiere a tanto células procariotas como células eucariotas. Las células huésped procariotas usadas comúnmente incluyen *E. coli*, *B. subtilis*, etc. Las células huésped eucariotas usadas comúnmente incluyen células de levadura, células de insecto, células mamíferas, etc. En una realización preferida, las células huésped usadas son células eucariotas; en otra realización preferida, las células huésped usadas son células mamíferas.

20 Después de que se han obtenido las células huésped transformadas, pueden cultivarse bajo un ambiente adecuado para expresar la proteína de fusión de la presente invención para expresar la proteína de fusión. La proteína de fusión expresada es después separada.

25 Como se usa en la presente y en las reivindicaciones, "trastornos neurológicos o enfermedades neurológicas" se refieren a apoplejía, lesión de médula, y trastornos neurológicos acompañados con lesión de la barrera hematoencefálica.

### Composición farmacéutica y Método de Administración de la Misma

30 Como el dímero de G-CSF de la presente invención tiene una vida media en suero excelente, el dímero de G-CSF y una composición farmacéutica que comprende el dímero de G-CSF como el ingrediente activo principal pueden usarse para tratar enfermedades asociadas con lesión neuronal, y para proteger neuronas. En una realización preferida, la enfermedad asociada con la lesión neuronal se selecciona de un grupo consistente de: apoplejía, lesión de médula, y trastornos neurológicos acompañados con lesión de la barrera hematoencefálica.

35 La composición farmacéutica de la presente invención comprende una cantidad segura y efectiva de dicho dímero de G-CSF y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. "Cantidad segura y efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente la condición del paciente con necesidad de él sin causar efectos secundarios serios. En general, la composición farmacéutica comprende 0,001-1.000 mg de dímero de G-CSF por dosis; en una realización preferida, la composición farmacéutica comprende 0,05-300 mg de dímero de G-CSF por dosis; en otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende 0,5-200 mg de dímero de G-CSF por dosis.

45 El compuesto de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden fabricarse en diferentes formulaciones, que comprenden una cantidad segura y efectiva de dicho dímero de G-CSF o sus sales farmacéuticamente aceptables y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. "cantidad segura y efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente la condición del paciente con necesidad de ello sin causar efectos secundarios serios. La cantidad segura y efectiva de un compuesto se determina de acuerdo a la edad, condición, curso de tratamiento, etc. del paciente en tratamiento.

50 "Excipiente o portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a rellenos líquidos o sólidos o materiales de gelatina con un o más tipos diferentes de compatibilidad que son adecuados para ser usados en humanos con suficiente pureza y toxicidad suficientemente baja. "Compatibilidad" se refiere a la capacidad de cada ingrediente de la composición de mezclarse mutuamente con el compuesto de la presente invención y la capacidad de mezclado mutua entre ellos, sin disminuir sustancialmente la eficacia clínica del compuesto. Algunos de los ejemplos de excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables incluyen celulosa y sus derivados (por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa de sodio, acetato de celulosa, etc.), gelatina, speckstone, agente lubricante sólido (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio), sulfato de calcio, aceite vegetal (por ejemplo aceite de guisante, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, etc.), polioles (por ejemplo propilenglicol, glicerol, manitol, sorbitol, etc.), emulsionante (por ejemplo, Tween®), agente humectante (por ejemplo, lauril sulfato de sodio), colorante, agente saborizante, estabilizador, antioxidante, antiséptico, agua libre de pirógenos, etc.

60 La vía de administración del dímero de G-CSF de la presente invención comprende administración oral, administración rectal, administración parenteral (intravenosa, intramuscular, o subcutánea), y administración parcial.

65 La forma sólida para administración oral comprende cápsulas, comprimidos, píldoras, polvo y gránulos. En estas formas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos uno de los excipientes (o portadores)

convencionalmente inertes como citrato de sodio, fosfato dicálcico, o cualquiera de los siguientes ingredientes: (a) agente de carga o relleno, por ejemplo, almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (b) agente de adhesión, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginato, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia; (c) humectantes, por ejemplo glicerol; (d) agente disgregante, por ejemplo, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o almidón de yuca, ácido algínico, silicato compuesto, y carbonato de sodio; (e) agente tampón, por ejemplo, cera de parafina; (f) agente acelerador de la absorción, por ejemplo, compuesto de amina cuaternaria; (g) agente humectante, por ejemplo, cetanol y monoestearato de glicerina; (h) absorbentes, por ejemplo, alba bolo; e (i). agente lubricante, por ejemplo, speckstone, estearato de calcio, estearato de sodio, polietilenglicol sólido, lauril sulfato de sodio, o cualquier mezcla de los mismos. Las cápsulas, comprimidos y píldoras pueden comprender también un agente tampón.

Las formas sólidas como comprimidos, píldoras de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimiento y materiales de protección del núcleo como revestimientos y otros materiales conocidos en la técnica. Estos materiales comprenden agente opacificante y el compuesto activo o compuesto en dicha composición puede ser liberado en una forma retardada de tal manera que la liberación se hace in cierta parte del canal alimenticio. Pueden usarse componentes de inclusión como materiales de polímero y materiales de cera. Si se desea, los compuestos activos pueden mezclarse con uno o más de los excipientes anteriormente mencionados para formular una forma de micro cápsula.

Las formas líquidas para administración oral comprenden emulsión, solución, suspensión, jarabe, o tintura farmacéuticamente aceptables. Aparte de los compuestos activos, las formas líquidas también comprenden diluyentes inertes usados convencionalmente en la técnica como agua u otro solvente, agente solubilizante y emulsionante como etanol, isopropanol, acetato de carbonato, acetato de etilo, propan-2-ol, 1,3-butan-2-ol, dimetilfomamida, y aceite, en particular aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de ricino, aceite de oliva, aceite de embrión de maíz, y aceite de sésamo o cualquier mezcla de los mismos.

Aparte de los diluyentes insertes, el compuesto también puede comprender aditivos, como agente humectante, agente emulsionante, agente de suspensión, agente edulcorante, correctores y especias.

Aparte de los compuestos activos, la suspensión también puede comprender agente de suspensión, como alcohol isoesteárico de etoxilo, sorbitol de polioxietileno, sorbitán, celulosa microcristalina, metóxido de aluminio, agar, o cualquier mezcla de los mismos.

Los compuestos usados para la administración parenteral pueden también comprender agua estéril fisiológicamente aceptable o solución anhidra, solución de dispersión, suspensión, o emulsión, y polvo estéril que puede redisolverse en solución inyectable estéril o solución de dispersión. El portador, agente diluyente, solvente o excipiente hidratado o anhidro apropiado comprende agua, etanol, polioles, y mezclas apropiadas de los mismos.

Las formas del dímero de G-CSF de la presente invención usadas para la administración parcial comprenden unguento, polvo, parche, rociador, e inhalador. Bajo condiciones estériles, los componentes activos pueden mezclarse con portador fisiológicamente aceptable y cualquier antiséptico, agente tampón o puede ser gas propelente si se desea.

El dímero de G-CSF de la presente invención puede administrarse solamente o puede administrarse en conjunción con cualquier compuesto farmacéuticamente aceptable.

Al usar la composición farmacéutica, se administra una cantidad segura y efectiva del dímero de G-CSF de la presente invención a un mamífero (por ejemplo humano) en uso del mismo en la que la dosificación administrada es una dosificación de administración farmacéuticamente aceptable efectiva. Para un humano de 60 kg, la dosificación de administración es habitualmente de 0,01-300 mg; en una realización preferida, la dosificación de administración es de 0,5-100 mg. En la determinación de la dosificación real, se tienen que considerar factores conocidos en la técnica como vía de administración, condición del paciente, etc.

Hay muchas ventajas del dímero de G-CSF de la presente invención que incluyen pero no están limitadas a:

1. Una vida media biológica in vivo más larga.
2. Una actividad biológica mejor al activar el STAT 3 en células neuronales.
3. Una eficacia clínica sustancial en una inyección individual o de dos veces en el modelo animal isquémico.

Las siguientes realizaciones ejemplares describen adicionalmente la presente invención. Aunque la descripción se refiere a realizaciones particulares, estará claro para alguien experto en la técnica que la presente invención se puede poner en práctica con variaciones de estos detalles específicos. Por lo tanto no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en la presente. Además, para las realizaciones en las que los detalles de los métodos experimentales no se describen, dichos métodos se llevan a cabo de acuerdo con

condiciones convencionales como las descritas en Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), o descritas por los fabricantes.

## Ejemplos

5 El dímero de G-CSF de la presente invención que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o que comprende complejos G-CSF-Fc con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOs: 2-7 con la estructura descrita en los mismos en las Figs. 1-3 se prepara y purifica por métodos convencionales. Los métodos ejemplos de los mismos se describen en los Ejemplos 1-3 siguientes.

### 10 **Ejemplo 1 - Construcción de un vector mamífero que expresa el dímero rhG-CSF**

Se sintetizó la secuencia de ADN de longitud completa que contiene G-CSF humano, un péptido conector, y un fragmento Fc de inmunoglobulina (IgG2) humana. En el extremo 5', se introdujeron las secuencias que contenían un enzima de restricción. Hind III, sitio, secuencia Kozak y péptido señal. En el extremo 3', se introdujo una secuencia que contenía el sitio EcoRI. La secuencia de ADN del dímero de G-CSF de longitud completa se clonó en pUC19 para resultar en pG-CSF-Fc. El plásmido se aplicó en *E.coli* TG1, y se digirió con Hind III y EcoRI, y se subclonó en vector pcDNA3 (Invitrogen) para resultar en el vector de expresión pEX-G-CSF-Fc. El pEX-G-CSF-Fc se linealizó y transfectó en células CHO por electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron en medio de selección y se clonaron. Los niveles de proteínas de los clones individuales se midieron por ELISA. Los clones con los niveles de expresión del dímero de G-CSF-Fc más altos se congelaron para generar el banco de células y se usaron para generación de proteínas recombinantes.

25 Como un ejemplo para ilustración la secuencia de ADN de longitud completa anteriormente mencionada que contenía G-CSF humano, un péptido conector y un fragmento Fc de inmunoglobulina (IgG2) humana tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente de las SEQ ID NOs: 2-7. Como tal, de acuerdo con los pasos anteriormente descritos, el vector de expresión resultante pEX-G-CSF-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente de las SEQ ID NOs: 2-7 se linealizó y transfectó en células CHO por electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron en medio de selección en el que se expresaron la mezcla de monómeros de G-CSF-Fc y dímeros de G-CSF-Fc. Los niveles de proteínas de los clones individuales se midieron por ELISA. Los clones con expresión del dímero G-CSF-Fc se seleccionaron primero y aquellos con los niveles de expresión del dímero de G-CSF-Fc más altos se congelaron para generar un banco de células y se usaron para la generación de proteínas recombinantes.

### 35 **Ejemplo 2 - Producción de la proteína del dímero de rhG-CSF en células mamíferas**

Un vial de células (~  $1 \times 10^7$  células/ml) del banco de células se descongeló y sembró en 10 ml de medio basal en una placa Petri de 10 cm y se incubó a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 24 horas.

40 La expansión de la siembra: El cultivo se expandió secuencialmente en matraces de agitación en 3-4 veces en volumen (por ejemplo de 10 ml a 30-40 ml). Cuando la densidad celular alcanzó  $1,0-1,5 \times 10^6$  células/ml con viabilidad  $\geq 90\%$ , el volumen de cultivo alcanzó 300-400 ml. Los matraces de agitación se incubaron a 120 rpm 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

45 Etapa 1 de la expansión del cultivo en biorreactor (3l-10l): Cuando la densidad celular en la expansión de la siembra alcanzó 300-400 ml a  $1,0-3,0 \times 10^6$  células/ml con viabilidad  $\geq 90\%$ , el cultivo expandido de la siembra se transfirió asépticamente a un biorreactor de 3-10 l que contenía medio basal, con las condiciones de control del cultivo a 37°C, pH de 6,8 oxígeno disuelto a aproximadamente el 50% y velocidad de agitación a 65-100 rpm.

50 Etapa 2 de la expansión del cultivo en biorreactor (30-100l): Cuando la densidad celular en el biorreactor de 3,0-10 l alcanzó  $1,0-3,0 \times 10^6$  células/ml con viabilidad  $\geq 90\%$ , el cultivo se transfectó asépticamente a un biorreactor de 30 -100 l que contenía un medio basal, con las condiciones de control del cultivo a 37°C, pH de 6,8 oxígeno disuelto a aproximadamente el 50% y velocidad de agitación a 65-100 rpm. El cultivo se alimentó a 12 a 48 horas para controlar el nivel de glucosa a o por debajo de 1 g/l con la adición de medio de alimentación por lotes antes de la recolección.

### 55 **Ejemplo 3 - Purificación de proteína del dímero de G-CSF humano recombinante**

60 El proceso de purificación de la proteína del dímero de G-CSF se llevó a cabo por cromatografía de afinidad, ya que la proteína del dímero de G-CSF contiene un fragmento Fc humano capaz de enlazar con la proteína A. El sobrenadante recolectado del biorreactor contiene multi-mero (o agregado) de G-CSF-Fc, dímero y complejo G-CSF-Fc y metabolitos. Después de ser recolectado del cultivo del biorreactor, el sobrenadante del cultivo celular se obtuvo por filtración, seguido por la purificación escalonada a temperatura ambiente usando una serie de columnas de cromatografía para obtener el producto recombinante purificado. Por ejemplo, se usó una columna de rProteína A Sepharose FF (GE Healthcare, cat#17-1279-04) típica con tampón de elución que contenía

65

50 mM de ácido cítrico/citrato de sodio y 0.2M de NaCl con pH 3,7-3,8, resultando en >90% de proteína de dímero de G-CSF pura por análisis HPLC de fase inversa. Los pasos de cromatografía adicionales se realizaron usando columna Canto Adhere en tampón de elución que contenía 50 mM de NaAC/HAC y 0.2 M NaCl con pH 4.5-5.0, seguido por SP Sepharose FF (GE Healthcare Cat #17-0729-04). El tampón de muestra usado era 50 mM de NaAC/HAC (pH 4.5-5.0), mientras que el tampón de equilibrio era 10 mM de PB (pH 6.0±0.1). El tampón de elución usado era 10 mM de PB y 0.3M NaCl (pH 7.2±0.1) con un caudal de 10-200 cm/hr dependiendo del tamaño de la columna. Los procesos adicionales implicaron la inactivación viral a pH bajo, filtración y equilibrio del tampón por diálisis.

10 La pureza de la proteína del dímero de G-CSF fue >95% por HPLC de fase inversa, con peso molecular estimado de 47±5 Kd por análisis SDS-PAGE reducido. La proteína del dímero de G-CSF se fue glicosilada con oligosacárido del 2-10% del peso molecular total. El punto isoeléctrico de la proteína estaba entre pH 5.8 a pH 6.8. La longitud de onda de absorción UV máxima era en 280 nM.

15 La proteína de fusión del dímero de G-CSF mostró las siguientes actividades biológicas *in vitro* incluyendo la estimulación de la proliferación y la activación de STAT3 en líneas celulares M-NSF-60 de una manera dependiente de la dosis. El ED50 para la activación y proliferación de STAT3 en células M-NSF-60 era de entre 0,1-10 ng/ml. La proliferación de las células M-NSF-60 estimulada por el dímero de G-CSF podría neutralizarse por el anticuerpo de G-CSF antihumano. Además, la proteína del dímero de G-CSF era capaz de activar el STAT3 en células neuronales primarias. La proteína de fusión del dímero de G-CSF mostró las siguientes actividades biológicas *in vivo* incluyendo el aumento rápido de los recuentos celulares en células blancas de la sangre (WBC), neutrófilos en animales normales o neutropénicos incluyendo, ratones, ratas y monos. La proteína del dímero de G-CSF también fue capaz de activar el STAT3 en neuronas primarias *in vitro* y de reducir el volumen de infarto del cerebro en el modelo de apoplejía isquémica aguda en ratas.

25

#### Ejemplo 4- vida media *in vivo* del dímero de G-CSF

Las ratas recibieron una única dosis de 100 µg/kg de dímero de G-CSF de la presente invención compuesto de dos complejos G-CSF-FC (SEQ ID NO: 3) por inyección subcutánea. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon y se enumeran en la Tabla 1 siguiente:

30

TABLA 1

Parametro (n=6)	Unidad	Valor Medio	SD
AUC <sub>(0-t)</sub>	ng/ml * h	4234.8	640.3
MRT <sub>(0-t)</sub>	h	21.6	1.4
t <sub>(1/2)</sub>	h	7.7	1.2
Clz/F	l/h/kg	0.024	0.003
C <sub>max</sub>	ng/ml	162.2	30.2

35

40

45 DE la Tabla 1 anterior, puede observarse que la vida media *in vivo* del dímero de G-CSF en ratas es de alrededor de 7,7 horas, mientras que la vida media *in vivo* del monómero de G-CSF es de alrededor de 2 horas.

#### Ejemplo 5 - Propiedades farmacocinéticas del dímero de G-CSF en humanos

50 Sujetos masculinos sanos recibieron una única dosis ascendente de 30, 60, 120, 240 µg/kg del dímero de G-CSF (G-CSF-D; compuesto de dos complejos G-CSF-Fc (SEQ ID NO: 6) por inyección subcutánea. Se incluyeron un total de 24 sujetos masculinos sanos y se les asignaron 4 cohortes de dosis individuales secuenciales de G-CSF-D (30, 60, 120 y 240 mg/kg).

55 Se recogieron muestras de sangre antes de la administración del fármaco y en las horas 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72, 96, Día 6 (120 horas), 7, 9, 11, 13 15 después de la dosificación. El suero se separó y se almacenó por debajo de -70°C. Las concentraciones de suero de G-CSF-D se midieron por un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA, Quantikine human G-CSF ELISA kit, R&D System, Inc. Minneapolis, Min, Cat: PDCS50).

60 Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando procedimientos analíticos no compartimentales estándar (WinNonlin v 5.2, Pharsight Corporation, USA). Los tiempos reales de la recolección de la muestra se usaron en los cálculos de los parámetros farmacocinéticos. C<sub>max</sub> (la concentración de plasma máxima observada durante el periodo de muestreo) y T<sub>max</sub> (el tiempo en el que tuvo lugar C<sub>max</sub>) se tomaron directamente de los datos. La constante de la tasa de eliminación Kel (hr<sup>-1</sup>) se determinó por regresión lineal de un mínimo de 3 puntos. El área bajo la concentración de plasma frente a la curva de tiempo (AUC) se determinó por la regla trapezoidal lineal, donde AUC<sub>último</sub> era el AUC del tiempo cero hasta el último punto de concentración. AUC<sub>(0-inf)</sub> era el AUC<sub>último</sub> y el último

65

punto de concentración dividido por Kel. La vida media ( $t_{1/2}$ ) se determinó de acuerdo con  $t_{1/2} = 0,693/Kel$  cuando era posible. El aclaramiento aparente (CL) se calculó como dosis/AUC<sub>(0-inf)</sub>.

Los resultados como se muestran en la Tabla 2 ilustraron que el dímero de G-CSF tenía un  $t_{1/2}$  entre 43,9 y 62,8 horas en humanos, mientras que la vida media del monómero de G-CSF tenía un  $t_{1/2}$  de aproximadamente 3,5 horas. El dímero de G-CSF por lo tanto tenía propiedades farmacocinéticas significativamente mejoradas por al menos 12 veces.

TABLA 2

Parámetro (n=6)	30µg/kg	60µg/kg	120µg/kg	240µg/kg
C <sub>max</sub> (ng/mL)	21.3 (10.3)	44.6 (17.7)	219.9 (76.6)	759 (160)
T <sub>max</sub> (h, media & intervalo)	8 (8-16)	8 (8-16)	16 (16-36)	36 (36)
$t_{1/2}$ (h)	43.9 (4.3)	56.1 (23.3)	59.3 (23.5)	62.8 (10.8)
AUC <sub>(0-inf)</sub> (ng.h/mL)	778 (213)	1847 (686)	8349 (2769)	46664 (17258)
CL/F (mL/h/kg)	41.4 (12.8)	36.8 (14.6)	18.5 (7.7)	5.7 (2.0)
Media (SD)				

#### Ejemplo 6 -Activación del transductor señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) por el dímero de G-CSF

Los ratones con barrera hematoencefálica lesionada o dañada pueden usarse para mostrar la bioactividad mejorada de la activación de pSTAT3 para el dímero de G-CSF. Primero, los ratones probados pueden dividirse en grupos diferentes de: grupo de control que recibe un control, grupo de G-CSF que recibe monómero de G-CSF y grupo de dímero de G-CSF que recibe dímero de G-CSF. El dímero de G-CSF usado en este estudio puede comprender dos complejos G-CSF-Fc y la secuencia de aminoácidos para dicho complejo G-CSF-Fc puede seleccionarse de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2-7. La cantidad de G-CSF y dímero de G-CSF inyectados respectivamente en el grupo de G-CSF y el dímero de G-CSF puede determinarse de tal manera que ambos grupos reciban prácticamente la proporción molar igual del G-cSF. Al final del estudio, los ratones pueden sacrificarse y se pueden recoger y lisar los tejidos cerebrales. El contenido del STAT3 fosforilado (pSTAT3) puede entonces medirse usando herramientas convencionales como un kit ELISA.

Al analizar los datos obtenidos de la realización de los procedimientos anteriormente mencionados, el grupo del dímero de G-CSF puede mostrar tener una bioactividad de activación de STAT3 más fuerte que el grupo del monómero de G-CSF.

#### Ejemplo 7 - Activación del STAT3 en neuronas primarias *in vitro*

Se recolectó cerebro de rata fetal de ratas SD hembra en el día 17 de gestación. El cerebro fetal completo se colocó en solución de D-Hanks en hielo. Se retiró cuidadosamente la corteza cerebral bajo microscopio y se cortó en piezas pequeñas de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. La corteza cerebral desmenuzada se digirió en 10 ml de 0,125% de tripsina, a 37° C durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió en DMEM que contenía 10% de FBS con pipeteado durante unos pocos minutos para detener la digestión de tripsina. Las células se centrifugaron y re-suspendieron en medio basal de cultivo de neuronas (Invitrogen, Cat 21103049) y B27 (Invitrogen, Cat 17504044) sin suero en placas de 12 pocillos con 5x10<sup>5</sup>/pocillo, y se incubaron a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 8 días. El medio se reemplazo una vez cada dos días.

Las células neuronales primarias después de 8 días de cultivo se trataron con portador de control, G-CSF o dímero de G-CSF compuesto de dos complejos G-CSF-Fc (SEQ ID NO: 6) a igual molar de concentración de G-CSF durante 15 minutos. Las células se lavaron después dos veces con PBS y se lisaron con tampón de lisis que contenía 20 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM de NaCl, 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM de EGTA, 1% de Triton, 2,5 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de beta-glicerofosfato, 1mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml de leupeptina, 1 mM de PMSF (Invitrogen, Cat 9803). La concentración de proteínas en el lisado se determinó usando ensayo de proteínas de Bradford. El contenido de pSTAT3 en los lisados celulares se midió usando un STAT3 ELISA kit (Invitrogen, Cat KH00481).

Los resultados en la Fig. 5 muestran que tanto el G-CSF como el dímero de G-CSF (representado por G-CSF-D en la Fig. 5) fueron capaces de activar el pSTAT3 en neuronas de rata primarias mostrando una cantidad de pSTAT3 significativamente elevada en comparación con la de los cultivos de control. A molar igual de G-CSF, el dímero de G-CSF muestra activar al menos 2 veces más pSTAT3 que los activados por el monómero de G-CSF. Por

lo tanto, el dímero de G-CSF tiene una bioactividad de activación de STAT3 más fuerte que la del monómero de G-CSF.

#### **Ejemplo 8 - Eficacia Clínica del dímero de G-CSF en estudio del modelo animal de isquemia cerebral focal**

5 La arteria cerebral media, MCA, es un sitio propenso a apoplejías para humanos. El modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) es referido generalmente como el modelo animal estándar para estudiar isquemia cerebral focal en el que uno de los métodos principales es la oclusión por hilado de la arteria cerebral media.

10 En este estudio se usaron ratas SD macho (250-300 g). Después de anestesiarse por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (dosificación de 50-60 mg/kg), las ratas se fijaron en una posición dorsal. Tras la incisión de la piel en el cuello derecho y disección roma del músculo esternocleidomastoideo y el músculo esternohioideo, se expusieron la arteria carótida común (CCA) derecha y el nervio vago. Se ligaron la CCA, la arteria carótida externa (ECA) y sus arterias de ramificación. La arteria carótida interna (ICA) se diseccionó has que las ramificaciones extracraneales de la arteria pterigopalatina podían observarse en la bulla timpánica y después que la ramificación se hubo ligado a su raíz. El hilado se preparó en el extremo cercano de la ICA mientras que la abrazadera de arteria se colocó en el extremo lejano de la ICA. Se hizo una pequeña incisión en el sitio de ligamiento de la ECA (5 mm desde la bifurcación de la ECA y la ICA) y un hilo de nylon con 0,22-0,249 mm de diámetro se insertó a través del corte de la ECA. El hilo se calentó antes de la inserción para hacer que el extremo de inserción se volviese romo y también se hizo marca para la longitud del hilo. Se apretó el hilo y se liberó la abrazadera de la arteria, seguido por la inserción del hilo de nylon en la ICA a través de la bifurcación de la ECA y la ICA. Se permitió entonces que el hilo de nylon procediese durante 17-19 mm al lugar de partida del cerebro anterior. La MCA se ocluyó entonces para dar como resultado isquemia cerebral focal.

25 Las ratas se dividieron en tres grupos con ocho ratas en cada grupo. Las ratas en el grupo de dímero de G-CSF compuesto de dos complejos G-CSF-Fc (SEQ ID NO: 3) se inyectaron subcutáneamente a una dosis de 100 µg/kg tras una isquemia de 30 minutos. El dímero de G-CSF se re-inyectó una vez después de 72 horas de modelado. Las ratas en el grupo de G-CSF, recibieron rhG-CSF diariamente a una dosis de 16 µg/kg/día por inyección subcutánea durante cinco días consecutivos. Como tal, al final del experimento, tanto los grupos del dímero de G-CSF como G-CSF recibieron igual molar de G-CSF. Las ratas en el grupo de control de solvente recibieron la misma dosis de PBS. El hilo de nylon se retiró lentamente tras una isquemia de 90 minutos para todos los grupos.

35 De los resultados de la Fig. 4, a igual dosificación molar, aunque el monómero de G-CSF mostró tener cierta eficacia clínica, no hay diferencia estadística entre este grupo de G-CSF y el grupo de control de solvente. Por otro lado, a igual dosificación molar, el dímero de G-CSF ilustró tener eficacia clínica significativa.

#### **Ejemplo 9 - Efectos del dímero de G-CSF en la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas**

40 Se usaron ratas SD (macho, 250 - 300 gramos) para el estudio. Los animales se dividieron en 5 grupos: Vehículo (MCAO + vehículo, n = 12), dímero de G-CSF (G-CSF-D; compuesto de dos complejos G-CSF-Fc (SEQ ID NO: 6)) (MCAO + G-CSF-D 30 ug/kg, n = 12), G-CSF-D (MCAO + rhG-CSF D 100 ug/kg, n = 12), G-CSF (MCAO + 40 ug/kg, n = 12), y grupo Sham (proceso quirúrgico + vehículo, n=12). El G-CSF-D se administró subcutáneamente a la 0,5 hora y 48 horas tras la perfusión sanguínea. El G-CSF se administró subcutáneamente 0,5, 12, 24 y 48 horas después de la perfusión sanguínea. Bajo anestesia, se expusieron la arteria carótida común derecha, (CCA), la arteria carótida interna (ICA), y la arteria carótida externa (ECA) a través de una incisión en la línea media del cuello. Se usó un monofilamento comercial (recubierto de silicio) como un oclisor y se insertó a través de la ECA. El oclisor se hizo avanzar en la ICO  $18 \pm 0,5$  mm más allá de la bifurcación de la carótida. La resistencia suave indicaba que el oclisor estaba presentado apropiadamente en la arteria cerebral anterior y bloqueó el flujo sanguíneo a la arteria cerebral media (MCA). Después de 60 minutos, se permitió perfusión extrayendo el monofilamento por aproximadamente 10 mm. La temperatura corporal se mantuvo a 36,5°C con una almohadilla de calentamiento durante el proceso de cirugía.

55 72 horas después de la cirugía, las ratas se re-anestesiaron y se decapitaron. se retiraron los cerebros y se seccionaron coronalmente en 6 porciones con 2 mm de grosor. Las porciones del cerebro se incubaron durante 30 minutos en una solución al 2% de cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) y se fijaron por inmersión en una solución de formalina tamponada al 10%. Las porciones del cerebro se fotografiaron y las áreas sin teñir se definieron como volumen infartado. El volumen infartado se midió usando Image-Pro Plus 5.1.

60 Los resultados como se muestran en la Fig. 6 ilustraron que a molar igual de proporción de G-CSF, el grupo administrado con dos tratamientos de dímero de G-CSF mostró solamente alrededor del 54% de volumen de infartado de cerebro en comparación con el grupo que recibió cuatro tratamientos del monómero de G-CSF. El dímero de G-CSF mostró eficacia terapéutica superior que el monómero de G-CSF en modelo de apoplejía de rata.

65 Las realizaciones ejemplares de la presente invención se describen así completamente. Aunque la

descripción se refiere a realizaciones particulares, estará claro para alguien experto en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica con variaciones de estos detalles específicos. Por lo tanto la invención no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en la presente.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Generon (Shanghai) Corporation Ltd.

10 <120> DÍMERO DE G-CSF HUMANO RECOMBINANTE Y USO DEL MISMO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

<130> P2011-0073

15 <150> CN 201010181623.5

<151> 2010-05-25

<160> 10

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 364

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<221> característica miscelánea

<223> Dímero de G-CSF

30 <400> 1

ES 2 611 151 T3

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



ES 2 611 151 T3

5 <210> 2  
 <211> 418  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> Dímero de G-CSF

<400> 2

```

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1          5          10          15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
          20          25          30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
          35          40          45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
          50          55          60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
65          70          75          80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
          85          90          95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
          100          105          110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
          115          120          125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
130          135          140

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

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro Gly Ser
          165          170          175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Arg
          180          185          190

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
          195          200          205

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
210          215          220

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
225          230          235

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
245          250          255
  
```

ES 2 611 151 T3

5

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg  
 260 265 270

10

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 275 280 285

15

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile Glu  
 290 295 300

20

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 305 310 315 320

25

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 325 330 335

30

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 340 345 350

35

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met  
 355 360 365

40

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 370 375 380

45

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 385 390 395 400

50

Gly Lys

55

<210> 3  
 <211> 418  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> Dímero de G-CSF

65

ES 2 611 151 T3

<400> 3

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val  
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
65 70 75 80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn  
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser  
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
165 170 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
245 250 255

Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly  
260 265 270

Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro  
275 280 285

Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro

5

10

290

295

300

15

Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser  
305 310 315 320

20

Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu  
325 330 335

25

Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu  
340 345 350

30

Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu  
355 360 365

35

Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe  
370 375 380

40

Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His  
385 390 395 400

45

Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala  
405 410 415

Gln Pro

50

<210> 4  
<211> 403  
<212> PRT  
<213> Artificial

55

<220>  
<221> característica miscelánea  
<223> Dímero de G-CSF

60

<400> 4

65

ES 2 611 151 T3

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
1                   5                   10                   15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
          20                   25                   30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
          35                   40                   45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
50                   55                   60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
65                   70                   75                   80

ES 2 611 151 T3

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp  
100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro  
115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
130 135 140

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

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro Ala Ser  
165 170 175

Thr Lys Gly Pro Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
180 185 190

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
210 215 220

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
225 230 235 240

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe  
245 250 255

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
260 265 270

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile  
275 280 285

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
290 295 300

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
305 310 315 320

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
325 330 335

ES 2 611 151 T3

5 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 340 345 350

10 Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 355 360 365

15 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 370 375 380

20 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 385 390 395 400

25 Pro Gly Lys

30 <210> 5  
 <211> 403  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> Dímero de G-CSF  
 <400> 5

ES 2 611 151 T3

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

ES 2 611 151 T3

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala  
210 215 220

Ser Thr Lys Gly Pro Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln  
225 230 235 240

Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp  
245 250 255

Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His  
260 265 270

Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala  
275 280 285

Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu  
290 295 300

Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala  
305 310 315 320

Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln  
325 330 335

Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu  
340 345 350

Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala  
355 360 365

Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser  
370 375 380

His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu

ES 2 611 151 T3

5 385 390 395 400

10 Ala Gln Pro

15 <210> 6  
<211> 413  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<221> característica miscelánea  
<223> Dímero de G-CSF

20 <400> 6

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp  
100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro  
115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
130 135 140

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

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro Gly Ser  
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Glu  
180 185 190

ES 2 611 151 T3

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 195 200 205

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 210 215 220

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln  
 225 230 235 240

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 245 250 255

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
 260 265 270

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 275 280 285

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 290 295 300

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 305 310 315 320

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 325 330 335

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 340 345 350

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly  
 355 360 365

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 370 375 380

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 385 390 395 400

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 405 410

<210> 7  
<211> 413  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<221> característica miscelánea  
<223> Dímero de G-CSF

10

<400> 7

ES 2 611 151 T3

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

ES 2 611 151 T3

5

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

10

Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu  
 260 265 270

15

Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu  
 275 280 285

20

Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro  
 290 295 300

25

Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly  
 305 310 315 320

30

Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro  
 325 330 335

35

Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe  
 340 345 350

40

Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala  
 355 360 365

45

Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln  
 370 375 380

50

Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu  
 385 390 395 400

Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 405 410

55 <210> 8  
 <211> 174  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> Dímero de G-CSF

<400> 8

65

ES 2 611 151 T3

5

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys  
1 5 10 15

10

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln  
20 25 30

15

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val  
35 40 45

20

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys  
50 55 60

25

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser  
65 70 75 80

30

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser  
85 90 95

35

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp  
100 105 110

40

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro  
115 120 125

45

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
130 135 140

50

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

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
165 170

55

<210> 9  
<211> 1368  
<212> ADN  
<213> Artificial

60

<220>  
<221> característica miscelánea  
<223> secuencia de codificación del dímero de G-CSF

65

<400> 9

ES 2 611 151 T3

5  
aagcttccca gacccatggc tggacctgcc acccagagcc ccatgaagct gatggccctg 60  
10  
cagctgctgc tgtggcacag tgcactctgg acagtgcagg aagccacccc cctggggcct 120  
gccagctccc tgccccagag cttcctgctc aagtgcttag agcaagtgag gaagatccag 180  
ggcgatggcg cagcgctcca ggagaagctg tgtgccacct acaagctgtg ccaccccag 240  
15  
gagctgggtgc tgctcggaca ctctctgggc atcccctggg ctcccctgag cagctgcccc 300  
agccaggccc tgcagctggc aggctgcttg agccaactcc atagcggcct tttcctctac 360  
20  
caggggctcc tgcaggccct ggaagggatc tcccccgagt tgggtccac cttggacaca 420  
ctgcagctgg acgtcgccga ctttgccacc accatctggc agcagatgga agaactggga 480  
atggcccctg ccctgcagcc caccagggt gccatgccgg ccttcgcctc tgctttccag 540  
25  
cgccgggcag gaggggtcct ggttgcctcc catctgcaga gcttcctgga ggtgtcgtac 600  
cgcgttctac gccaccttgc ccagcccgga tccggtggcg gttccggtgg aggcggaagc 660  
30  
ggcgggtggag gatcagagcg caaatgttgt gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct 720  
gtggcaggac cgtcagctct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780  
35  
cggaccccctg aggtcacgtg cgtgggtggg gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag 840  
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc acgggaggag 900  
cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc gtccctaccg ttgtgcacca ggactggctg 960  
40  
aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccagcctc catcgagaaa 1020  
accatctcca aaaccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080  
45  
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggctcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc 1140  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccaca 1200  
50  
cctcccatgc tggactccga cggctccttc ttccctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260  
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcagaggc tctgcacaac 1320  
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gagaattc 1368

55  
<210> 10  
<211> 1353  
<212> ADN  
<213> Artificial

60  
<220>  
<221> característica miscelánea  
<223> secuencia de codificación del dímero de G-CSF

65 <400> 10

ES 2 611 151 T3

aagcttccca gacccatggc tggacctgcc acccagagcc ccatgaagct gatggccctg	60
cagctgctgc tgtggcacag tgcactctgg acagtgcagg aagccacccc cctggggcct	120
gccagctccc tgccccagag cttcctgctc aagtgcttag agcaagtgag gaagatccag	180
ggcgatggcg cagcgctcca ggagaagctg tgtgccacct acaagctgtg ccaccccgag	240
gagctgggtgc tgctcggaca ctctctgggc atcccctggg ctcccctgag cagctgcccc	300
agccaggccc tgcagctggc aggctgcttg agccaactcc atagcggcct tttcctctac	360
caggggctcc tgcaggccct ggaagggatc tcccccgagt tgggtccac cttggacaca	420
ctgcagctgg acgtcgccga ctttgccacc accatctggc agcagatgga agaactggga	480
atggcccctg ccctgcagcc caccagggt gccatgccgg ccttcgcctc tgctttccag	540
cgccgggcag gaggggtcct ggttgcctcc catctgcaga gcttcctgga ggtgtcgtac	600
cgcgttctac gccaccttgc ccagcccgga tccggtggcg gttccggtgg aggcggaagc	660
ggcgggtggag gatcagtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca	720
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg	900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtttg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	960
aagtgcaagg tctccaacaa aggctccca gcctccatcg agaaaacat ctccaaaacc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacacctcc catgctggac	1200
tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctccacctgg acaagagcag gtggcagcag	1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta cacgcagaag	1320
agcctctccc tgtctccggg taaatgagaa ttc	1353

**Reivindicaciones**

1. Un dímero del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano de fórmula (I)

5 (I) M1-L-M2

en la que

10 M1 es un primer monómero de G-CSF;  
M2 es un segundo monómero de G-CSF; y  
L es un conector que conecta dicho primer monómero y dicho segundo monómero y está dispuesto entre ellos;  
en donde L es un polipéptido de fórmula (II):

15 (II) -Z-Y-Z

en la que

20 Y es una proteína portadora formada por dos fragmentos Fc conectados a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos; y  
Z es un péptido corto que comprende de 0 a 30 aminoácidos;

en la que dicho dímero de G-CSF retiene la actividad biológica del G-CSF y se produce por dos complejos G-CSF-Fc, cada uno de dichos complejos G-CSF-Fc comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

25 2. El dímero de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha actividad biológica comprende:

- 30 a) actuar en los granulocitos de neutrófilos y células madre para impulsar la diferenciación, crecimiento y maduración de neutrófilos; y  
b) activar neutrófilos maduros para participar en la respuesta inmune.

3. Una composición farmacéutica que comprende como su ingrediente activo, un dímero purificado de acuerdo con la reivindicación 1.

35 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 en la que dicho dímero tiene una pureza de 90-100%.

40 5. El dímero de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho complejo G-CSF-Fc comprende un fragmento Fc de IgG2 humana y dicho dímero se forma a través del emparejamiento de dos de dichos fragmentos Fc a través de una pluralidad de enlaces de disulfuro dispuestos entre ellos.

6. El dímero de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho número de enlaces de disulfuro dispuesto entre ellos es 2 ó 4.

45 7. Un dímero del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6 para su uso en un método para tratar un trastorno neurológico.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 ó 4 para su uso en un método para tratar un trastorno neurológico.

50 9. El dímero de la reivindicación 7 o la composición de la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico, en el que el trastorno neurológico se selecciona de un grupo consistente de: apoplejía, lesión de médula, y trastornos neurológicos acompañados con lesión de la barrera hematoencefálica.

55 10. Un método para la fabricación de un dímero de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende los pasos de:

- 60 a) transformar células mamíferas con un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica un complejo G-CSF-Fc que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10;  
b) cultivar dichas células mamíferas transformadas bajo condiciones suficientes para expresar dicho complejo G-CSF-Fc y dicho dímero; y  
c) aislar y purificar dicho dímero obtenido del paso (b);

en la que dicho dímero comprende los dos complejos G-CSF-Fc mencionados, cada uno de dichos complejos G-CSF-Fc comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

65

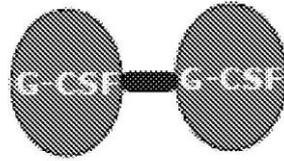


Fig. 1

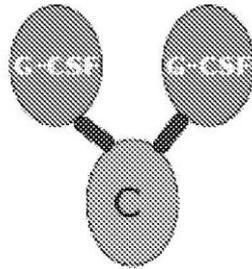


Fig. 2a

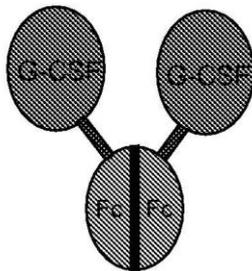


Fig. 2b

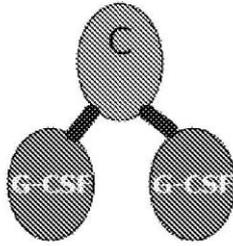


Fig. 3a

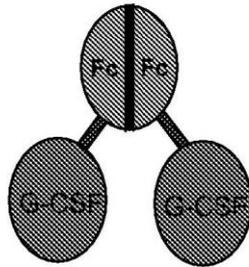


Fig. 3b

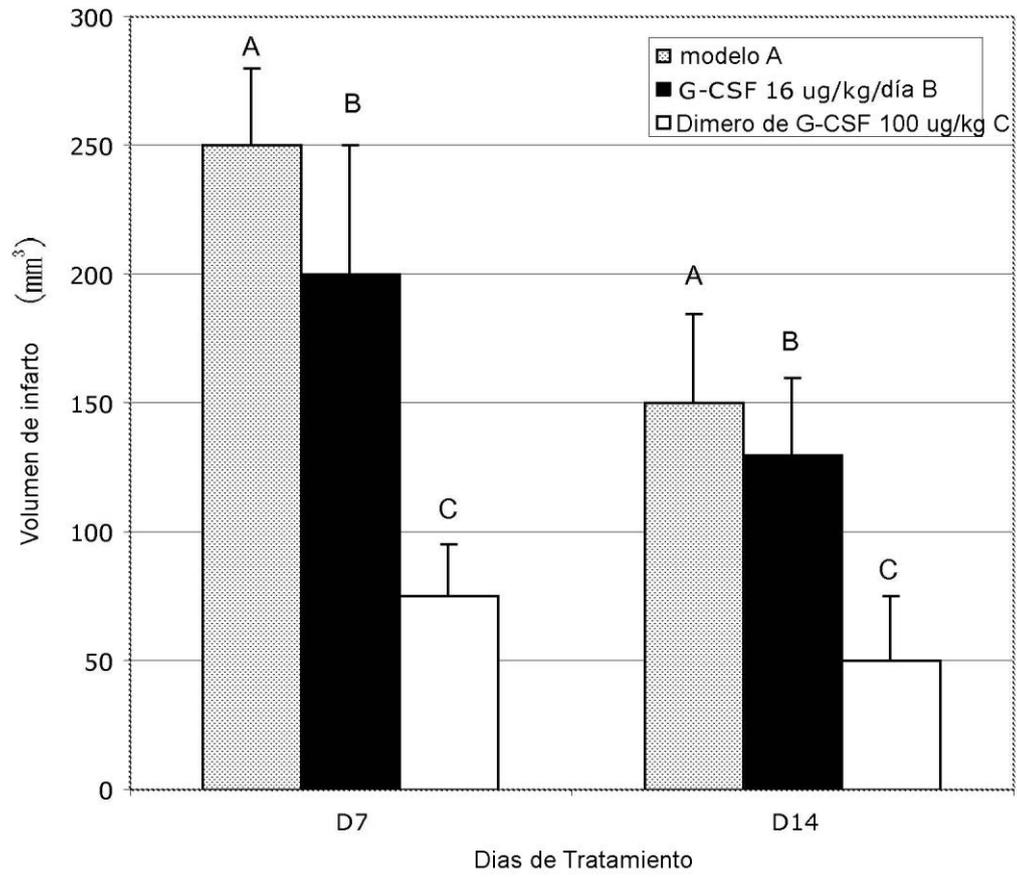


Fig. 4

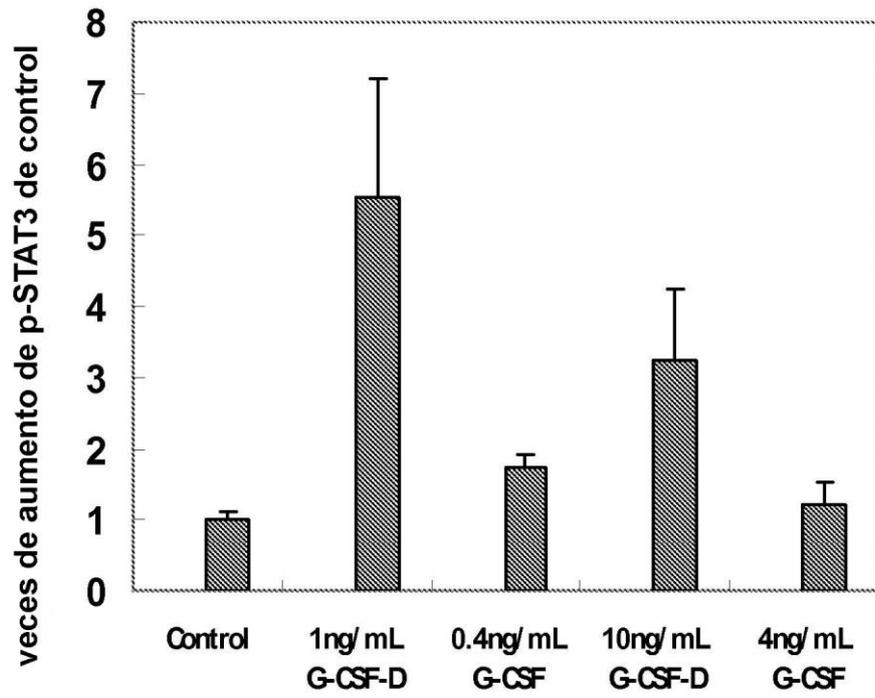


Fig. 5

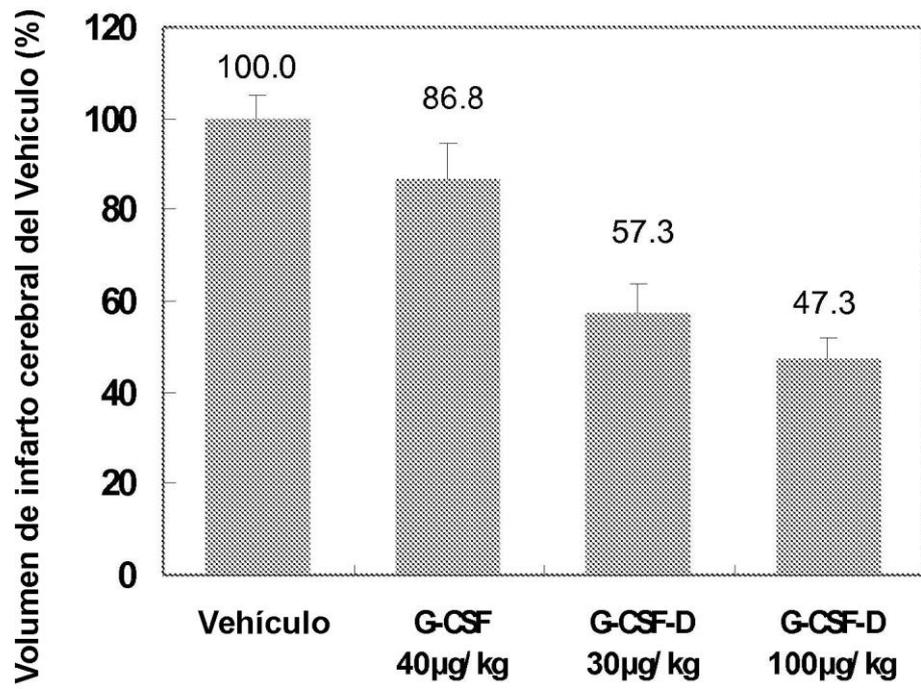


Fig. 6