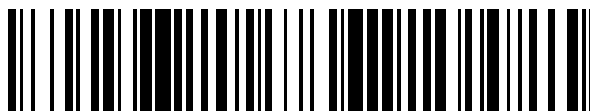


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 668**

51 Int. Cl.:

|                    |                              |           |
|--------------------|------------------------------|-----------|
| <b>C07K 14/00</b>  | (2006.01) <b>A61K 38/18</b>  | (2006.01) |
| <b>C07K 14/52</b>  | (2006.01) <b>C12N 15/62</b>  | (2006.01) |
| <b>C07K 14/505</b> | (2006.01) <b>C07K 14/555</b> | (2006.01) |
| <b>C07K 14/575</b> | (2006.01) <b>C07K 14/59</b>  | (2006.01) |
| <b>C12N 15/00</b>  | (2006.01) <b>C07K 14/61</b>  | (2006.01) |
| <b>C12N 5/00</b>   | (2006.01)                    |           |
| <b>A61K 38/00</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A61K 38/19</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A61K 38/24</b>  | (2006.01)                    |           |
| <b>A61K 31/00</b>  | (2006.01)                    |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2007** **E 14197286 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017** **EP 2853536**

54 Título: **Polipéptidos de eritropoyetina de acción prolongada y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**03.02.2006 US 764761 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.10.2017**

73 Titular/es:

**OPKO BIOLOGICS LTD. (100.0%)**  
**16 Ashlegan Street**  
**Kiryat Gat, 8211804, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 636 668 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Polipéptidos de eritropoyetina de acción prolongada y usos de los mismos

**5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

Se desvelan polipéptidos, y polinucleótidos que los codifican, que comprenden péptidos carboxi terminales (CTP) de gonadotropina coriónica unidos a un péptido de interés. También se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de la invención y usos de los mismos.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

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

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

30

La Patente de Estados Unidos n.º 5.759.818 describe unidades parciales y completas de péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica para modificar proteínas y péptidos biológicamente activos en el extremo amino de estas proteínas y péptidos, y alterar sus patrones de depuración.

**35 RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una primera secuencia de AA de CTP de gonadotropina coriónica unida a un extremo amino del péptido EPO, y una segunda y tercera secuencias AA de CTP unidas a un extremo carboxi de un péptido EPO.

40

La presente invención proporciona un polipéptido modificado por CTP que consiste en una eritropoyetina (EPO), y tres CTP, en el que dichos CTP son péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana, en el que el primer CTP está unido al extremo amino de dicha EPO, y el segundo y tercer CTP están unidos al extremo carboxi de dicha EPO, en el que dichos CTP comprenden la  
45 secuencia aminoacídica SSSSKAPPPS, en el que dicha EPO carece de un péptido señal, y en el que la secuencia aminoacídica de dicho polipéptido modificado por CTP comprende la secuencia de aminoácidos 28-277 de la SEQ ID NO: 3 o los aminoácidos 28-249 de la SEQ ID NO: 6.

En una realización, el polipéptido modificado por CTP es para su uso como un medicamento.

50

En otra realización, el polipéptido modificado por CTP es para su uso en el tratamiento o reducción de la incidencia de anemia.

La presente invención también proporciona un polipéptido modificado por CTP que consiste en una eritropoyetina (EPO), y tres CTP, en el que dichos CTP son péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana, en el que el primer CTP está unido al extremo amino de dicha EPO, y el segundo y el tercer CTP están unidos al extremo carboxi de dicha EPO, para su uso en la estimulación de la eritropoyesis, la mejora de los niveles de hemoglobina, o una combinación de las mismas, en el que dichos CTP comprenden la secuencia aminoacídica SSSSKAPPPS, y en el que dicho polipéptido modificado por CTP estimula la

55

eritropoyesis.

En una realización, la secuencia de al menos uno de los tres CTP comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18.

5

En otra realización, al menos uno de los tres CTP está truncado, y el CTP truncado comprende al menos un sitio de glucosilación.

En una realización, la EPO está glucosilada. En una realización alternativa, la EPO no está glucosilada.

10

En una realización, al menos uno de los tres CTP está glucosilado.

En una realización, al menos uno de los tres CTP está unido a la EPO a través de un enlazador.

15 En una realización, el polipéptido comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de los residuos 28-277 de la SEQ ID NO: 3, los residuos 28-249 de la SEQ ID NO: 6, los residuos 1-277 de la SEQ ID NO: 3 y los residuos 1-249 de la SEQ ID NO: 6.

20 En una realización, la EPO carece de un péptido señal. En otra realización, el polipéptido modificado por CTP comprende además un péptido señal. En una realización, el péptido señal está codificado por la SEQ ID NO: 19.

La presente invención también proporciona una formulación farmacéutica que comprende un polipéptido modificado por CTP de la invención, en la que la formulación comprende además un tampón, tal como un tampón citrato o acetato, y un agente de tonicidad, tal como cloruro sódico. En una realización, la formulación se formula para su inyección en un recipiente multidosis, opcionalmente con un conservante, tal como cloruro de benzalconio o timerosal. En una realización, la formulación es una formulación líquida.

En una realización, la formulación farmacéutica es para su uso como un medicamento.

30 En una realización, la formulación farmacéutica es para su uso en el tratamiento o reducción de la incidencia de anemia, para estimular la eritropoyesis, o para mejorar los niveles de hemoglobina, o cualquier combinación de los mismos, en un sujeto.

La presente solicitud también desvela un método de tratamiento o reducción de la incidencia asociada con anemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del EPO-CTP, tratando de este modo al sujeto que tiene anemia.

35

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

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

La figura 1A - es un diagrama del polipéptido de SEQ ID NO: 1

La figura 1B es un diagrama del polipéptido de SEQ ID NO: 2

La figura 1C es un diagrama del polipéptido de SEQ ID NO: 3

La figura 1D es un diagrama del polipéptido de SEQ ID NO: 4.

45

La figura 1E es un diagrama del polipéptido de SEQ ID NO: 5.

La figura 1F es un diagrama del polipéptido de SEQ ID NO: 6.

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

50

La figura 3 es un gráfico que ilustra la bioactividad *in vivo* de derivados de hEPO recombinantes y EPO-3 (SEQ ID NO: 3). Los ratones ICR (n = 7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 µg/kg) durante tres semanas de EPO-3, rhEPO-WT (SEQ ID NO: 16), Recormon (EPO comercial) o Recormon (5 µg/kg) 3 veces por semana. Se inyectó IV PBS a los animales de control. Se recogieron muestras de sangre tres veces a la semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa la media de grupo de hematocrito (%) ± SE.

55

La figura 4 es un gráfico que ilustra la bioactividad *in vivo* de derivados de hEPO recombinantes y EPO-1 (SEQ ID NO: 1). Los ratones ICR (n = 7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 µg/kg) durante tres semanas de EPO-1, rhEPO-WT (SEQ ID NO: 16), Recormon o Recormon (5 µg/kg) 3 veces por

semana. Se inyectó IV PBS a los animales de control. Se recogieron muestras de sangre tres veces a la semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa la media de grupo de hematocrito (%)  $\pm$  SE.

La figura 5 es un gráfico que ilustra la bioactividad *in vivo* de derivados de hEPO recombinantes y EPO-2 (SEQ ID NO: 2). Los ratones ICR (n = 7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15  $\mu$ g/kg) durante tres semanas de EPO-2 (SEQ ID NO: 2), rhEPO-WT (SEQ ID NO: 16), Recormon o Recormon (5  $\mu$ g/kg) 3 veces por semana. Se inyectó IV PBS a los animales de control. Se recogieron muestras de sangre tres veces a la semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa la media de grupo de hematocrito (%)  $\pm$  SE.

La figura 6 es un gráfico temporal que ilustra el cambio en el nivel de reticulocitos después de una única dosis en bolo de EPO-0 (SEQ ID NO: 16), EPO-3 (SEQ ID NO: 3) y Aranesp.

La figura 7 es un gráfico temporal que ilustra el cambio en el nivel de hemoglobina (presentado como cambio desde el valor inicial) tras una única dosis en bolo de EPO-0 (SEQ ID NO: 16), EPO-3 (SEQ ID NO: 3) y Aranesp.

La figura 8 es un gráfico temporal que ilustra el cambio en el nivel de hematocrito después de una única dosis en bolo de EPO-0 (SEQ ID NO: 16), EPO-3 (SEQ ID NO: 3) y Aranesp.

La figura 9 es un gráfico que ilustra el cambio en la concentración en suero de EPO -0 (SEQ ID NO: 16), EPO-3 (SEQ ID NO: 3) y Aranesp posterior a inyección i.v.

La figura 10 es una transferencia de Western que ilustra el peso molecular e identidad de MOD-4020 (SEQ ID NO: 36), MOD-4021 (SEQ ID NO: 37), MOD-4022 (SEQ ID NO: 38), MOD-4023 (SEQ ID NO: 39) y MOD-4024 (SEQ ID NO: 40). El gel de PAGE SDS se transfirió y se tiñó usando anticuerpos monoclonales anti-hGH. La fotografía indica que como hGH comercial y de tipo silvestre, las variantes de MOD-7020-4 se reconocen por anticuerpos anti-hGH.

La figura 11 es un gráfico de barras que ilustra el aumento de peso de ratas hipofisectomizadas después de la administración de los polipéptidos de GH-CTP de la presente invención.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente solicitud invención describe polipéptidos de acción prolongada y métodos de producción y uso de los mismos. Los polipéptidos de acción prolongada comprenden el péptido carboxi terminal (PCT) de gonadotropina coriónica humana (GCh). En una realización, el CTP actúa como una protección contra la degradación de proteínas o péptidos derivados del mismo. En una realización, el CTP amplía las semividas circulatorias de las proteínas o péptidos derivados del mismo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un polipéptido modificado por CTP que consiste en una eritropoyetina (EPO), y tres CTP, en el que dichos CTP son péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana, en el que el primer CTP está unido al extremo amino de dicha EPO, y el segundo y tercer CTP están unidos al extremo carboxi de dicha EPO, en el que dichos CTP comprenden la secuencia aminoácida SSSSKAPPPS, en el que dicha EPO carece de un péptido señal, y en el que la secuencia aminoácida de dicho polipéptido modificado por CTP comprende la secuencia de aminoácidos 28-277 de la SEQ ID NO: 3 o los aminoácidos 28-249 de la SEQ ID NO: 6.

La presente invención también proporciona un polipéptido modificado por CTP que consiste en una eritropoyetina (EPO), y tres CTP, en el que dichos CTP son péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana, en el que el primer CTP está unido al extremo amino de dicha EPO, y el segundo y el tercer CTP están unidos al extremo carboxi de dicha EPO, para su uso en la estimulación de la eritropoyesis, la mejora de los niveles de hemoglobina, o una combinación de las mismas, en el que dichos CTP comprenden la secuencia aminoácida SSSSKAPPPS, y en el que dicho polipéptido modificado por CTP estimula la eritropoyesis.

Las expresiones "péptido CTP", "péptido carboxi terminal" y "secuencia de CTP" se usan de forma intercambiable en el presente documento. En una realización, el péptido carboxi terminal es un CTP de longitud completa. En otra realización, el péptido carboxi terminal es un CTP truncado. En esta invención, los CTP comprenden la secuencia aminoácida SSSSKAPPPS.

Las expresiones "péptido EPO" y "secuencia de EPO" se usan de forma intercambiable en el presente documento. En una realización, el péptido EPO es una proteína EPO. En otra realización, el péptido carboxi terminal es una proteína EPO truncada.

En otra realización, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan de forma intercambiable en el presente documento. En otra realización, "secuencia" cuando se hace referencia a un polinucleótido puede referirse a una porción codificante.

5

En otra realización, "péptido de interés" y "secuencia polipeptídica de interés" se usan de forma intercambiable en el presente documento. En otra realización, el péptido de interés es una proteína de longitud completa. En otra realización, el péptido de interés es un fragmento proteico.

10 En otra realización, el péptido carboxi terminal (CTP) se une con la secuencia polipeptídica de interés a través de un enlazador. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP con la secuencia polipeptídica de interés es un enlace covalente. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP con la secuencia polipeptídica de interés es un enlace peptídico. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP con la secuencia polipeptídica de interés es un enlace peptídico sustituido.

15

La frase "secuencia polipeptídica de interés" se refiere a polipéptidos de eritropoyetina (EPO). En otra realización, el péptido está glucosilado. En otra realización, el péptido no está glucosilado.

En otra realización, el péptido carboxi terminal (CTP) de Gonadotropina Coriónica humana (hCG) está condensado a EPO.

20

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

25

En esta invención, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y una secuencia de CTP adicional unida conjuntamente a la secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal proporcionan una protección mejorada contra la degradación de una proteína.

30

En algunas realizaciones, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y una secuencia de CTP adicional unida conjuntamente a la secuencia CTP en el extremo carboxi terminal proporcionan una semivida extendida de la proteína unida. En algunas realizaciones, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y una secuencia de CTP adicional unida conjuntamente a la secuencia CTP en el extremo carboxi terminal proporcionan una actividad mejorada de la proteína unida.

35

En otra realización, el péptido carboxi terminal (CTP) de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos (AA) de AA 112 a la posición 145 de gonadotropina coriónica humana, como se expone en la SEQ ID NO: 17. En otra realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende la secuencia de AA de AA 118 a la posición 145 de gonadotropina coriónica humana, como se expone en la SEQ ID NO: 18. En otra realización, la secuencia de CTP también comienza desde cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 de gonadotropina coriónica humana. En algunas realizaciones, el péptido de la secuencia de CTP es de 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 AA de longitud y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia de AA de CTP.

45

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

50

55

al menos un 95 % homóloga a la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de la misma.

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

10

En otra realización, al menos una de las secuencias de AA de CTP de gonadotropina coriónica está truncada. En otra realización, 2 de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, 2 o más de las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, todas las secuencias de AA del CTP de gonadotropina coriónica están truncadas. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 10 AA de la SEQ ID NO:43, es decir, la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 11 AA de la SEQ ID NO:43. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 12 AA de la SEQ ID NO:43. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 13 AA de la SEQ ID NO:43. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 14 AA de la SEQ ID NO:43. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 15 AA de la SEQ ID NO:43. En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 16 AA de la SEQ ID NO:43. En otra realización, el CTP truncado comprende los últimos 14 AA de la SEQ ID NO:43.

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

En algunas realizaciones, se utiliza eritropoyetina (EPO) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. En algunas realizaciones, cualquier secuencia de AA que codifica EPO es una secuencia de EPO. En algunas realizaciones, cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica EPO es una secuencia de EPO. En algunas realizaciones, la unión de la secuencia de CTP tanto a los extremos amino como carboxi de la proteína EPO da como resultado un aumento de la potencia en la estimulación de la eritropoyesis (figuras 3-5) y (Tabla 5 del Ejemplo 4), en comparación con EPO recombinante y otras combinaciones de EPO y CTP. En algunas realizaciones, una EPO unida a tres secuencias de CTP no altera la unión con su receptor como se demuestra en la Tabla 3 del Ejemplo 3 que demuestra que EPO unida con tres secuencias de CTP es igualmente eficaz en la estimulación de la proliferación de células TF-1 que EPO de tipo silvestre. En algunas realizaciones, los polipéptidos EPO-CTP de la presente invención se exponen en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 6.

En una realización, "eritropoyetina" se refiere a la eritropoyetina de mamífero. En una realización, "eritropoyetina" se refiere a eritropoyetina humana, tal como se expone en el n.º de acceso a GenBank AAA52400.

45

En una realización, la secuencia de eritropoyetina o la secuencia EPO de la presente invención también se refiere a homólogos. En una realización, la secuencia de AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos un 50 % homóloga a una secuencia de eritropoyetina expuesta en el N.º de acceso a GenBank AAA52400 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos un 60 % homóloga a una secuencia de eritropoyetina expuesta en el N.º de acceso a GenBank AAA52400 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos un 70 % homóloga a una secuencia de eritropoyetina expuesta en el N.º de acceso a GenBank AAA52400 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos un 80 % homóloga a una secuencia de eritropoyetina expuesta en el N.º de acceso a GenBank AAA52400 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos un 90 %

homóloga a una secuencia de eritropoyetina expuesta en el N.º de acceso a GenBank AAA52400 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto. En una realización, la secuencia de AA de eritropoyetina de la presente invención es al menos un 95 % homóloga a una secuencia de eritropoyetina expuesta en el N.º de acceso a GenBank AAA52400 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto.

En otra realización, el polipéptido modificado por CTP de la invención sirve para su uso en el tratamiento o reducción de la incidencia de anemia.

10

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en el tratamiento de anemia. Se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o expuesto en la SEQ ID NO: 2, o expuesto en la SEQ ID NO: 3, o expuesto en la SEQ ID NO: 4, o expuesto en la SEQ ID NO: 5, o expuesto en la SEQ ID NO: 6, o expuesto en la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para su uso en el tratamiento de anemia.

15

Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de la anemia. Se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de anemia.

20

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en la inhibición de anemia. Se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o expuesto en la SEQ ID NO: 2, o expuesto en la SEQ ID NO: 3, o expuesto en la SEQ ID NO: 4, o expuesto en la SEQ ID NO: 5, o expuesto en la SEQ ID NO: 6, o expuesto en la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para su uso en la inhibición de anemia.

30

Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de anemia. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de anemia.

40

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en el tratamiento de anemia asociada a un tumor. Se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o expuesto en la SEQ ID NO: 2, o expuesto en la SEQ ID NO: 3, o expuesto en la SEQ ID NO: 4, o expuesto en la SEQ ID NO: 5, o expuesto en la SEQ ID NO: 6, o expuesto en la SEQ ID NO: 16, expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de anemia asociada a tumor.

45

Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de anemia asociada a tumor. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de anemia asociada a tumor.

50

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en la inhibición de anemia asociada a tumor. Se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o expuesto en la SEQ

ID NO: 2, o expuesto en la SEQ ID NO: 3, o expuesto en la SEQ ID NO: 4, o expuesto en la SEQ ID NO: 5, o expuesto en la SEQ ID NO: 6, o expuesto en la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para su uso en la inhibición de anemia asociado a tumor.

5

Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de anemia asociada a tumor. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de anemia asociada a tumor.

10

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en el tratamiento de hipoxia tumoral. Se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, o la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 4, o la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de hipoxia tumoral.

15

Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de hipoxia tumoral. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de hipoxia tumoral.

20

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en el tratamiento de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos. También se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, o la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 4, o la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos.

25

Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos.

30

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos. También se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, o la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 4, o la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos.

35

Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico

40

45

50

55

expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la inhibición de infecciones crónicas tales como VIH, enfermedad intestinal inflamatoria, o episodios sépticos.

- 5 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de síndrome de fatiga después de quimioterapia contra el cáncer. También se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, o la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 4, o la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP
- 10 en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de síndrome de fatiga tras quimioterapia contra el cáncer.

- Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el
- 15 tratamiento de síndrome de fatiga tras quimioterapia contra el cáncer. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para el tratamiento de síndrome de fatiga tras quimioterapia contra el cáncer.

- 20 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en la mejora del injerto de células madre. También se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, o la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 4, o la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 16, o
- 25 expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para mejorar el injerto de células madre.

- Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la
- 30 mejora del injerto de células madre. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para la mejora del injerto de células madre.

- 35 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para su uso en el aumento de la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. También se desvela en el presente documento un péptido EPO expuesto en la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, o la SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 4, o la SEQ ID NO: 5, o la SEQ ID NO: 6, o la SEQ ID NO: 16, o expuesto en la SEQ ID NO: 22, que tiene
- 40 adicionalmente al menos un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C para aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. Se desvela en el presente documento una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido EPO que tiene adicionalmente un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para
- 45 aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica o síndrome mielodisplásico. También se desvela en el presente documento un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 20 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y al menos un péptido de AA de CTP en el extremo C o un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 21 que codifica un péptido EPO y un péptido de AA de CTP en el extremo N y dos péptidos de AA de CTP en el extremo C para aumentar la tasa de supervivencia de un paciente con anemia aplásica
- 50 o síndrome mielodisplásico.

- En algunas realizaciones, la homología de acuerdo con la presente invención también incluye delecciones, inserciones o variantes de sustitución, incluyendo una sustitución de AA, de las mismas y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de las mismas. En una realización, la variante de sustitución comprende una glicina en la
- 55 posición 104 de la secuencia de AA de eritropoyetina está sustituida por una serina (SEQ ID NO: 22).

Como se desvela en el presente documento, la hormona de crecimiento humana (hGH) puede utilizarse, como alternativa, de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación. Como se desvela en el presente documento, la unión de la secuencia de CTP a los extremos tanto amino como carboxi de la proteína hGH da como resultado un

aumento de la potencia (figura 11).

Sin embargo, en esta invención, la secuencia polipeptídica de interés es una EPO.

- 5 En una realización, la invención se emplea en medicina veterinaria. En una realización, la presente invención proporciona el tratamiento de mamíferos domesticados que se mantienen como compañeros humanos (por ejemplo, perros, gatos, caballos), que tienen valor comercial significativo (por ejemplo, vacas lecheras, ganado de carne, animales deportivos), que tienen valor científico significativo (por ejemplo, especímenes cautivos o libres de especies en peligro de extinción), o que tienen valor de otro modo.
- 10 En una realización, se administran polipéptidos, anticuerpos o polinucleótidos de la presente invención a un animal (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, cobaya, cerdos, cerdo enano, pollo, camello, cabra, caballo, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano y ser humano. En una realización, las aplicaciones enumeradas tienen usos en una amplia diversidad de huéspedes. En algunas realizaciones, dichos huéspedes incluyen, pero sin limitación, ser
- 15 humano, murino, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, ratón, rata, hámster, cerdo, cerdo enano, pollo, cabra, vaca, oveja, perro, gato o primate no humano.
- En una realización, se tratan animales de granja por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales de granja incluyen cerdos, vacas, vacas lecheras, caballos, cabras, ovejas, pollos, pavos, gansos, patos y especies relacionadas. En una realización, se tratan animales de laboratorio por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales de laboratorio incluyen ratas, ratones, cobayas, conejos, cabras, monos, perros, gatos y otros. En una realización, se tratan animales de zoológico por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales de zoológico incluyen todos los animales vertebrados mantenidos en zoológicos. En una realización, se tratan animales acuáticos por los métodos de la presente invención. En una realización, los
- 20 animales acuáticos incluyen peces, anguilas, tortugas, focas, pingüinos, tiburones, ballenas y especies relacionadas. En una realización, se tratan animales domesticados por los métodos de la presente invención. En una realización, los animales domesticados incluyen cualquier mascota, tal como perros y gatos, o animal que se mantiene por seres humanos, por ejemplo, caballos, vacas, cerdos, cabras, conejos, pollos, pavos, gansos, patos y similares.
- 30 De acuerdo con la presente invención, el término cerdos incluye cerdos, lechones, puercos, lechonas, cerdos castrados jóvenes, jabalíes y cerdas. En otra realización, "ganado bovino" se refiere a terneros, vacas, vacas lecheras, vaquillas, novillos y toros.
- En una realización, se utiliza EPO bovina por los métodos de la presente invención. En una realización, la EPO
- 35 bovina artificial se utiliza por los métodos de la presente invención. En una realización, la EPO bovina artificial tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número NP\_776334. En otra realización, la EPO bovina es cualquier otra EPO bovina conocida en la técnica.
- En una realización, se utiliza EPO de cerdo por los métodos de la presente invención. En una realización, la EPO de
- 40 cerdo tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número NP\_999299. En otra realización, la EPO de cerdo es cualquier otra EPO de cerdo conocida en la técnica.
- En una realización, se utiliza EPO de oveja por los métodos de la presente invención. En una realización, la EPO de
- 45 oveja tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número NP\_001019908. En otra realización, la EPO de oveja es cualquier otra EPO de oveja conocida en la técnica.
- En una realización, se utiliza EPO murina por los métodos de la presente invención. En una realización, la EPO
- 50 murina tiene una secuencia expuesta en la secuencia del NCBI ID número CAA72707. En otra realización, la EPO murina es cualquier otra EPO murina conocida en la técnica.
- En algunas realizaciones, la modificación de secuencia de CTP es ventajosa para permitir usar dosificaciones menores.
- En algunas realizaciones, "polipéptido" como se usa en el presente documento incluye polipéptidos nativos
- 55 (productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos polipeptídicos, que tienen, en algunas realizaciones, modificaciones que hacen a los polipéptidos aún más estables cuando están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células.

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

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

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

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

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

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

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

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

En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para generar los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, mayores de 18-25 AA). En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de grandes cantidades del polipéptido de la presente invención. En algunas realizaciones, se describen técnicas recombinantes por Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153: 516-

544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185: 60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310: 511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224: 838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463.

5

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

10

15 En algunas realizaciones, los polinucleótidos que expresan los polipéptidos de la presente invención son como se exponen en las SEQ ID NOs: 20 y 21.

Los promotores específicos de tejido adecuados incluyen secuencias que son funcionales en poblaciones celulares específicas, los ejemplos incluyen, pero sin limitación, promotores tales como albúmina que es específica de hígado [Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277], promotores específicos linfoides [Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275]; en particular promotores de los receptores de linfocitos T [Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8: 729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740], promotores específicos de neuronas tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlun et al. (1985) *Science* 230:912-916] o promotores específicos de glándula mamaria tales como el promotor de suero de la leche (Pat. de Estados Unidos N.º 4.873.316 y la Publicación de Solicitud Europea N.º 264.166). Los promotores inducibles adecuados para su uso con la presente invención incluyen, por ejemplo, el promotor inducible por tetraciclina (Srour, M.A., et al., 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).

20

25

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

30

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

35

En una realización, "secuencia polinucleotídica genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por lo tanto, representa una porción contigua de un cromosoma.

40

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

45

En una realización, los polinucleótidos comprenden además una secuencia señal que codifica un péptido señal para la secreción de los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, las secuencias señal incluyen, pero sin limitación, la secuencia señal endógena para EPO como se expone en SEQ ID NO: 19 o la secuencia señal endógena para IFN- $\beta$ 1 como se expone en la SEQ ID NO: 26. La secuencia señal puede ser N terminal a la secuencia de CTP que es a su vez N terminal a la secuencia polipeptídica de interés; por ejemplo, la secuencia es (a) secuencia señal, (b) CTP, (c) secuencia de interés, (d) dos secuencias de CTP adicionales. En una realización, después de la expresión y la secreción, los péptidos señal se escinden de las proteínas precursoras dando como resultado las proteínas maduras.

50

55

En algunas realizaciones, los polinucleótidos pueden prepararse usando técnicas de PCR como se describe en el

Ejemplo 1, o cualquier otro método o procedimiento conocido por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento implica la ligación de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

- 5 En una realización, los polinucleótidos se insertan en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante de la presente invención. En una realización, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para replicación e integración en procariotas. En una realización, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para replicación e integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión incluye un vector
- 10 lanzadera que hace a este vector adecuado para la replicación e integración tanto en procariotas como en eucariotas. En algunas realizaciones, los vectores de clonación comprenden secuencias de inicio de la transcripción y traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).
- 15 Puede usarse una diversidad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión en huéspedes para expresar los polipéptidos de la presente invención. En algunas realizaciones, estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vector de expresión de ADN cosmídico que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de polipéptidos;
- 20 sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante, tales como plásmido Ti, que contienen la secuencia codificante del polipéptido.

En algunas realizaciones, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo, sistemas de expresión de

- 25 mamíferos tales como células CHO) para expresar el polipéptido de la presente invención. En una realización, el vector de expresión usado para expresar polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a neomicina. Se describe la construcción del vector pCI-dhfr, de acuerdo con una realización, en el Ejemplo 1.

- 30 En algunas realizaciones, en sistemas bacterianos, pueden seleccionarse provechosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. En una realización, se desean grandes cantidades de polipéptido. En una realización, se desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado al periplasma de la bacteria o el medio de cultivo en el que el producto proteico se purifica fácilmente. En
- 35 una realización, ciertas proteínas de fusión se modifican por ingeniería genética con un sitio de escisión específico para ayudar en la recuperación del polipéptido. En una realización, los vectores adaptables a dicha manipulación incluyen, pero sin limitación, la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier et al., Methods in Enzymol. 185: 60-89 (1990)].
- 40 En una realización, se usan sistemas de expresión de levaduras. En una realización, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles en levadura como se desvela en la Solicitud de Pat. de Estados Unidos n.º 5.932.447. En otra realización, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN ajeno en el cromosoma de levadura.

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

En algunas realizaciones, los vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero sin limitación, pcDNA3,

- 50 pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Strategene, pTRES que está disponible en Clontech, y sus derivados.

- 55 En algunas realizaciones, pueden usarse vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas realizaciones, los vectores derivados de virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Barr incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMT010/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permite la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor

temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se ha mostrado que son eficaces para la expresión en células eucariotas.

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

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

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

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

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

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

- Se apreciará que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), las construcciones de expresión también puede incluir secuencias modificadas por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad  
55 del polipéptido expresado.

Pueden usarse diversos métodos, en algunas realizaciones, para introducir el vector de expresión en el sistema celular huésped. En algunas realizaciones, dichos métodos se describen generalmente en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et

al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores víricos recombinantes. Además, véase, la Pat. de Estados Unidos N.º 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En una realización, la producción de polipéptidos CTP-EPO-CTP usando tecnología de ADN recombinante se ilustra en el Ejemplo 1.

En algunas realizaciones, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y se purifican; su eficacia terapéutica puede ensayarse *in vivo* o *in vitro*. En una realización, las actividades de unión de los polipéptidos EPO recombinantes de

la presente invención se pueden determinar usando diversos ensayos como se describe en los Ejemplos 2-6 y 8-9. En una realización, la actividad de unión *in vitro* se determina midiendo la capacidad del polipéptido para estimular la proliferación de células TF-1. En una realización, la actividad *in vivo* se deduce analizando los niveles de hematocrito (figuras 3-5) y/o como porcentaje de reticulocitos.

5

En una realización, los polipéptidos de EPO de la presente invención son para su uso en el tratamiento de un sujeto con una diversidad de afecciones asociadas con eritropoyetina. En algunas realizaciones, un sujeto es un sujeto humano.

10 En algunas realizaciones, la expresión "afecciones asociadas a eritropoyetina" se refiere a cualquier afección asociada con una modulación de eritropoyetina inferior a normal, anormal o inadecuada. En alguna realización, los niveles de eritropoyetina asociados con tales afecciones se determinan por cualquier medida aceptada y utilizada por los expertos en la técnica. En alguna realización, las afecciones asociadas con eritropoyetina típicamente incluyen afecciones anémicas.

15

En algunas realizaciones, las "afecciones anémicas" se refieren a cualquier afección, enfermedad o trastorno asociado con la anemia. En algunas realizaciones, las afecciones anémicas incluyen, pero sin limitación, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, trasplante de médula ósea, síndrome de Churg-Strauss, anemia de Diamond Blackfan, anemia de Fanconi, síndrome Felty, enfermedad de injerto contra huésped, trasplante de células madre hematopoyéticas, síndrome urémico hemolítico, síndrome mielodisplásico, hemoglobinuria paroxística nocturna, osteomielofibrosis, pancitopenia, aplasia pura de glóbulos rojos, púrpura de Schoenlein-Henoch, anemia sideroblástica, anemia refractaria con exceso de blastocitos, artritis reumatoide, síndrome de Shwachman, anemia de células falciformes, talasemia mayor, talasemia menor, púrpura trombocitopénica, etc.

20

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

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

30

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

35

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

40

45

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

50

55

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

Se encuentran técnicas para formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA.

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

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

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

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

35 La administración oral, en una realización, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende comprimidos, cápsulas, grageas, comprimidos masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Dichas formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y eficaz del compuesto, o los compuestos, deseados cada uno de los cuales está en una realización, de aproximadamente 0,7 o 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra realización, de aproximadamente 0,5 o 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de formas de dosificación unitarias para administración peroral se conocen bien en la técnica. En algunas realizaciones, los comprimidos típicamente comprenden adyuvantes convencionales farmacéuticamente compatibles como diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes tales como almidón, gelatina y sacarosa; disgregantes tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una realización, pueden usarse emolientes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla de polvos. En una realización, pueden añadirse agentes colorantes, tales como colorantes FD&C, para la apariencia. Los edulcorantes y agentes saporíferos, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y sabores de frutas, son adyuvantes útiles para comprimidos masticables. Las cápsulas típicamente comprenden uno o más diluyentes sólidos desvelados anteriormente. En algunas realizaciones, la selección de componentes vehículo depende de consideraciones secundarias como el sabor, el coste y la estabilidad en almacenamiento, que no son críticas para los fines de la presente invención, y puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.

55 En una realización, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación prolongada. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación lenta. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos

masticables de liberación inmediata. En una realización, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el perfil de liberación deseado del principio activo farmacéutico como se conoce por los expertos en la técnica.

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

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

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

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

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

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

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

En una realización, las preparaciones descritas en el presente documento se formulan para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. En algunas realizaciones, se presentan formulaciones para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. En algunas realizaciones, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o de dispersión.

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

algunas realizaciones, anestesia local u otros activos. Las composiciones pueden usarse como pulverizaciones, nebulizaciones, gotas y similares.

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

En otra realización, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibíd.*, págs. 317-327; véase generalmente *ibíd.*).

En otra realización, la composición farmacéutica a administrar en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se usa una bomba (véase Langer, anteriormente; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88: 507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321: 574 (1989). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos. En otra realización más, puede situarse un sistema de liberación controlada en proximidad a la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249: 1527-1533 (1990)).

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

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

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

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

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

Algunos ejemplos de sustancias que pueden actuar como vehículos farmacéuticamente aceptables o componentes de los mismos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y metil celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tales como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato cálcico; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo,

- aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico; emulsionantes tales como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tales como lauril sulfato sódico; agentes colorantes; agentes saporíferos; agentes de formación de comprimidos, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; y
- 5 soluciones de tampón fosfato. La elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar junto con el compuesto se determina básicamente por el modo en que va a administrarse el compuesto. Si el compuesto objeto se va a inyectar, en una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH se ha ajustado a aproximadamente 7,4.
- 10 Además, las composiciones comprenden adicionalmente aglutinantes (por ejemplo, goma arábica, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etil celulosa, goma guar, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón sódico), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en superficies,
- 15 detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo lauril sulfato sódico), potenciadores de la permeación, agentes de solubilización (por ejemplo, glicerol, polietilen glicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizadores (por ejemplo hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo carbómero, dióxido de silicio coloidal, etil celulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por
- 20 ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato sódico), ayuda de fluidificación (por ejemplo dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo carbómero, hidroxipropil celulosa, lauril sulfato sódico), revestimientos poliméricos (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes formadores de revestimientos y películas (por ejemplo, etil celulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.
- Los componentes típicos de vehículos para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión
- 30 típicos incluyen metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, celulosa (por ejemplo, Avicel™, RC-591), tragacanto y alginato sódico; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y polioxietilen sorbitán (por ejemplo, polisorbato 80). Los conservantes típicos incluyen metil parabeno y benzoato sódico. En otra realización, las composiciones líquidas perorales también contienen uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes saporíferos y colorantes desvelados anteriormente.
- 35 Las composiciones también incluyen la incorporación del material activo en o sobre preparaciones de partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos, o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo*.
- 40 También se comprenden por la invención composiciones en partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado con anticuerpos dirigido contra receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplado con ligandos de receptores específicos de tejido.
- 45 En algunas realizaciones, los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. En otra realización, los compuestos modificados muestran semividas sustancialmente más prolongadas en sangre después de inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes. En una realización, las modificaciones también aumentan la solubilidad del compuesto en solución
- 50 acuosa, eliminan la agregación, potencian la estabilidad física y química del compuesto y reducen en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra realización, la actividad biológica deseada *in vivo* se consigue por la administración de dichos aductos de polímero-compuesto menos frecuentemente o en menores dosis que con el compuesto no modificado.
- 55 En algunas realizaciones, puede estimarse la preparación de la cantidad o dosis eficaz inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. En una realización, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos.

En una realización, pueden determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el

presente documento por procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una realización, los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular e *in vitro* y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. En una realización, las dosificaciones varían dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. En una realización, la formulación, vía de administración y dosificación exactas pueden seleccionarse por el médico individual a la vista de la afección del paciente. [Véase, por ejemplo, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág. 1].

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

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

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

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

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

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

#### **Ejemplos**

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se expone en las Pat. de Estados Unidos N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds.

(1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan en todo este documento otras referencias generales.

A continuación, los Ejemplos 1 a 6 se consideraran como parte de la invención en la medida que se refieran a los polipéptidos modificados por CTP que consisten en una eritropoyetina (EPO) y tres CTP, en los que un primer CTP de gonadotropina coriónica está unido al extremo amino de la EPO, y el segundo y tercer CTP de gonadotropina coriónica están unidos al extremo carboxi de la EPO, como se reivindica. Los Ejemplos 7 y 8 son comparativos.

### EJEMPLO 1

#### 15 Generación de construcciones de EPO

##### MATERIALES Y MÉTODOS:

**Construcción del vector de expresión pCI-dhfr:** El vector de expresión de mamífero pCI-neo se adquirió en Promega (catálogo n.º E1841). El vector contiene un potenciador/promotor IE de CMV y gen de neomicina fosfotransferasa. El clon pSV2-dhfr se adquirió en la ATCC (Catálogo N.º 37146). El plásmido contiene el gen dhfr murino. La construcción del vector pCI-dhfr se realizó como se indica a continuación:

- a. Se digirió el plásmido pSV2-dhfr con la enzima de restricción BglII (extremo 3' del gen dhfr). Se usó ADN polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) para llenar los salientes 5' para formar extremos romos. Después se digirió el ADN con la enzima de restricción AvrII (extremo 5' del gen dhfr). Se aisló el fragmento del gen dhfr (extremo romo de AvrII).
- b. El vector pCI-neo se digirió con la enzima de restricción BstXI (extremo 3' del gen neo). Se usó ADN polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) para retirar los salientes 3' para formar extremos romos. Después se digirió el ADN con la enzima de restricción AvrII (extremo 5' del gen neo). Se aisló el vector de expresión (extremo romo de AvrII).
- c. El gen dhfr se ligó en el vector pCI para formar un vector de expresión que contenía el gen dhfr (pCI-dhfr).

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

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

**Tabla 1**

| Número de cebador | SEQ ID NO | secuencia                                | Sitio de restricción (subrayado en la secuencia) |
|-------------------|-----------|------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1                 | 7         | 5' AATCTAGAGGTCATCATGGGGGTGC 3'          | XbaI                                             |
| 2                 | 8         | 5' ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG 3'   | NotI                                             |
| 17 <sup>R</sup>   | 9         | 5' TAAATATTGGGGTGTCCGAGGGCCC 3'          | SspI                                             |
| 10                | 10        | 5' CCAATATTACCAAGCCCCACCACGCCTCAT 3'     | SspI                                             |
| 11 <sup>R</sup>   | 11        | 5'TGCGGCCGCGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC 3' | NotI                                             |
| 15                | 12        | 5' GCCCTGCTGTGCGAAGC 3'                  |                                                  |
| 2 <sup>R</sup>    | 13        | 5' ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG      | NotI                                             |
| 23 <sup>R</sup>   | 14        | 5'CTTTGAGGAAGAGGAGCCCAGGACTGGGAGGC3'     |                                                  |
| 24                | 15        | 5' CCTGGGCTCCTCTTCCTCAAAGGC 3'           |                                                  |
| 38 <sup>R</sup>   | 16        | 5' GCTTCCGACAGCAGGGC 3'                  |                                                  |

**EPO-1 701-1-p17-6 (Epo-1 - SEQ ID NO: 1):** El fragmento XbaI-NotI de 702 pb se construyó por PCR usando los cebadores anteriores (SEQ ID NOs: 7-16). Después, el fragmento de PCR XbaI-NotI que contenía la secuencia Epo-ctp en el vector de expresión pCI-dhfr.

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

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

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

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

**EPO-3-p56-6 (Epo-3 SEQ ID NO; 3):** Los cebadores se adquirieron en Sigma-Genosys. Se realizó una reacción de PCR usando el cebador 15 (SEQ ID NO: 12) y el cebador 2<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 13) y ADN plasmídico de pCI-dhfr- EPO-  
20 ctp x2 (701-2-p24-2) como un molde. Como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 486 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se aisló un fragmento Stu I -NotI que contenía una secuencia \*Epo-ctp x2 (209 pb).

Se realizaron tres reacciones de PCR secuenciales. La primera reacción se realizó con el cebador 1 (SEQ ID NO: 7)  
25 y el cebador 23<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 14) y ADN plasmídico de pGT123-epo-ctp como una plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 80 pb (péptido señal).

La segunda reacción se realizó con el cebador 24 (SEQ ID NO: 15) y el cebador 11<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 11) y ADN  
30 plasmídico de 701-4-p42-1 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 610 pb.

La última reacción se realizó con los cebadores 1 (SEQ ID NO: 7) y 11<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 11) y una mezcla de los  
35 productos de las dos reacciones previas como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 700 pb y se aisló el fragmento XbaI-StuI.

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

**EPO-5-p91-4 (Epo-5 SEQ ID NO; 5 - (ctp- Epo):** Se pidieron cebadores de Sigma-Genosys. Se realizó una reacción  
40 de PCR usando el cebador 1 (SEQ ID NO: 7) y el cebador 11<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 11) y ADN plasmídico de pCI-dhfr-ctp-  
EPOctp x2 (701-3-p56-6) como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 670  
pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó el fragmento XbaI-NotI que  
contenía la secuencia de ctp-Epo en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 701-5-p91-4.

**EPO-6-p90-1 (Epo-6 SEQ ID NO: 6 - (ctp- Epo-ctp):** Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se  
45 realizó con el cebador 1 (SEQ ID NO: 7) y el cebador 38<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 16) y ADN plasmídico de 701-3-p56-6 como  
un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 400 pb.

La segunda reacción se realizó con el cebador 15 (SEQ ID NO: 12) y el cebador 2<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 13) y ADN  
50 plasmídico de 701-1-p17-6 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de  
390 pb.

La última reacción se realizó con los cebadores 1 (SEQ ID NO: 7) y 2<sup>R</sup> (SEQ ID NO: 13) y una mezcla de los  
55 productos de las dos reacciones anteriores como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó  
un producto 787 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI-NotI  
que contenía la secuencia ctp-Epo-ctp se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 701-  
6-p90-1.

**EJEMPLO 2****Expresión y aislamiento de polipéptidos EPO-CTP****MATERIALES Y MÉTODOS**

5

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

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

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

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

**RESULTADOS**

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

**Tabla 2**

| <b>N.º de versión</b>    | <b>N.º de clon</b> | <b>Título de reserva IU/ml<sup>1</sup></b> | <b>Post-dilución en sob. Mock de acuerdo con el título de Epo3 IU/ml<sup>2</sup></b> | <b>Post-ultrafiltración IU/ml<sup>3</sup></b> |
|--------------------------|--------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Epo0<br>SEQ ID NO:<br>16 | 17                 | 3093                                       | 102                                                                                  | 335                                           |
| Epo1<br>SEQ ID NO:<br>1  | 47                 | 1049                                       | 104                                                                                  | 291                                           |
| Epo2<br>SEQ ID NO:<br>2  | 67                 | 2160                                       | 110                                                                                  | 303                                           |
| Epo3                     | 85                 | 105                                        | 119                                                                                  | 392                                           |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |      |    |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|----|-----|
| SEQ ID NO:<br>3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |      |    |     |
| Epo4<br>SEQ ID NO:<br>4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 112 | 6100 | ND | 342 |
| 1. La concentración de la reserva de variantes de EPO se determinó por ELISA (ELISA Quantikine IVD Epo, DEP00, R&D Systems)<br>2. Las muestras EPO-0, 1, 2 y 4 se diluyeron a 105 UI/ml en sob. mock (ajustadas a título de Epo3). Epo0 = EPO de tipo silvestre expresada en el mismo sistema que las EPO modificadas por CTP<br>3. Todas las muestras se concentraron y se dializaron por ultrafiltración frente a PBS hasta una concentración final de 180 UI/ml. |     |      |    |     |

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

### EJEMPLO 3

5

#### **Actividad biológica de los polipéptidos EPO-CTP de la presente invención**

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

### MATERIALES Y MÉTODOS

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

### RESULTADOS

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

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

40

**Tabla 3**

| <b>PATRÓN<br/>Eprex</b> | <b>Bioactividad de TF-1 IU/ml</b> |                          |                          |                          |                          |          |                  |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|------------------|
| IU/ml                   | EPO 0<br>SEQ ID NO:<br>16         | EPO 1<br>SEQ ID<br>NO: 1 | EPO 2<br>SEQ ID<br>NO: 2 | EPO 3<br>SEQ ID<br>NO: 3 | EPO 4<br>SEQ ID<br>NO: 4 | Recormon | Patrón de<br>EPO |
| 2                       | 4,93                              | 2,32                     | 2,13                     | 6,91                     | 3,55                     | 3,44     | 7,40             |
| 0,5                     | 1,60                              | 0,76                     | 0,53                     | 1,34                     | 0,84                     | 0,87     | 1,53             |

## CONCLUSIÓN

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

## EJEMPLO 4

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

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Animales:**

Especies/Cepa: Ratones ICR o CD-1 de cualquier sexo de aproximadamente 20-25 g

Tamaño del grupo: n = 7

N.º de grupos: 9

N.º total de animales: n = 63

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

**Tabla 4**

| Grupo n.º | N.º de ratones por grupo | TRATAMIENTO        |                | Régimen de dosificación |
|-----------|--------------------------|--------------------|----------------|-------------------------|
|           |                          | Compuesto          | Nivel de dosis |                         |
| 1         | n = 7                    | Vehículo (Control) | 0              | 1 vez a la semana       |
| 2         |                          | MOCK               |                |                         |
| 3         |                          | MOD-7010           | 15 µg/kg       |                         |
| 4         |                          | MOD-7011           |                |                         |
| 5         |                          | MOD-7012           |                |                         |
| 6         |                          | MOD-7013           |                |                         |
| 7         |                          | MOD-7014           |                |                         |
| 8         |                          | rhEPO comercial    | 15 µg/kg       | 3 veces a la semana     |
| 9         |                          |                    | 5 µg/kg        |                         |

**Tratamiento de los animales:** A todos los animales se les administró control o los polipéptidos EPO de ensayo de la presente invención por inyección en bolo. El volumen de inyección no excedió de 10 ml/kg. La longitud del experimento fue de 22 días. Se realizó diariamente una comprobación de morbilidad y mortalidad.

**Examen de recuento de reticulocitos y hematocrito (hct):** Se llevó a cabo un recuento de reticulocitos en todos los animales de ensayo el día 2 y 14 h después de la 1ª inyección de vehículo o tratamiento respectiva. Se determinó el HCT en todos los animales una vez antes del tratamiento inicial (control del valor inicial "0") y a las 24 h después de la 1ª inyección de vehículo o tratamiento respectiva, y a continuación dos veces por semana hasta el final del estudio (Día 22).

## RESULTADOS

Los resultados de hematocrito que se ilustran en las figuras 3-5 muestran que EPO 3 tiene el porcentaje de cambio de hematocrito mayor desde el valor inicial en comparación con EPO 1, EPO 2, Recormon 1, Recormon 3, rhEPO y vehículo. Los resultados que demuestran el porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con los polipéptidos EPO-CTP se resumen en la Tabla 5 a continuación en el presente documento. Estos resultados muestran que EPO-3 es

el estimulador de eritropoyesis más potente.

**Tabla 5**

| <b>Días</b>        | <b>% de reticulocitos</b> |           |
|--------------------|---------------------------|-----------|
|                    | <b>2</b>                  | <b>14</b> |
| Control            | 3,72                      | 3,46      |
|                    | 1,08                      | 0,8       |
| Mock               | 3,5                       | 3,64      |
|                    | 0,6                       | 1,13      |
| 7010 SEQ ID NO: 16 | 3,5                       | 3,9       |
|                    | 0,6                       | 1,54      |
| 7011 SEQ ID NO: 1  | 3,52                      | 1,94      |
|                    | 1,38                      | 1,08      |
| 7012 SEQ ID NO: 2  | 3,82                      | 3,0       |
|                    | 1,02                      | 0,88      |
| 7013 SEQ ID NO: 3  | 2,66                      | 5,20      |
|                    | 0,97                      | 2,96      |
| 7014 SEQ ID NO: 4  | 3,48                      | 3,82      |
|                    | 0,71                      | 0,90      |
| Recormon 1/S       | 3,23                      | 3,27      |
|                    | 0,73                      | 0,59      |
| Recormon 3/s       | 4,13                      | 4,24      |
|                    | 1,21                      | 1,14      |

## 5 CONCLUSIÓN

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

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

## EJEMPLO 5

### **Comparación de los polipéptidos EPO-CTP de la presente invención con Aranesp**

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Animales:**

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

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

**Tabla 6**

| Grupo n.º | Artículo de ensayo | animales/grupo/punto de tiempo | Conc. de la solución de dosis (µg/ml) | Volumen de dosis (ml/kg) | Puntos temporales * (horas después de la administración) |
|-----------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------|
|-----------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------|

|   |                              |   |     |    |                                                                                                                  |
|---|------------------------------|---|-----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | MOD-7010<br>SEQ ID<br>NO: 11 | 3 | 1,5 | 10 | 0 (Pre-dosis), 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 h posteriores a la administración de la dosis |
| 2 | MOD-7013<br>SEQ ID<br>NO: 3  | 3 | 1,5 | 10 | 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 h posteriores a la administración de la dosis                |
| 3 | Aranesp                      | 3 | 1,5 | 10 | 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 h posteriores a la administración de la dosis                |

**Tratamiento de los animales:** A todos los animales se les administró control o los polipéptidos EPO de ensayo de la presente invención por inyección en bolo. El volumen de inyección no excedió de 10 ml/kg. La longitud del experimento fue de 14 días. Se realizó diariamente una comprobación de morbilidad y mortalidad.

5

**Examen de recuento de reticulocitos y hematocrito (hct):** El examen de recuento de reticulocitos y hematocrito se realizó como se ha descrito anteriormente.

## RESULTADOS

10

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

## 15 EJEMPLO 6

### *Comparación de la farmacocinética de los polipéptidos EPO-CTP de la presente invención con Aranesp*

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

20

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de suero para determinar los niveles de concentración específicos para cada muestra. La concentración y los datos de puntos temporales se procesaron usando análisis no compartimentalizado WinNonLin. Los parámetros determinados incluían: AUC, CL, Ke, t<sub>1/2</sub>, C<sub>máx</sub>, T<sub>máx</sub>, y Vdz.

25

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

30

## RESULTADOS

Los resultados del análisis farmacocinético se resumen en la Tabla 7, a continuación en el presente documento.

Estos resultados muestran que EPO 3 mostró medidas farmacocinéticas favorables como se indica por ejemplo en las medidas de AUC, t<sub>1/2</sub> y C<sub>máx</sub>. Las medidas de T<sub>máx</sub> fueron iguales a EPO-0, EPO-3 y Aranesp.

35

**Tabla 7**

| Parámetros       | Unidades | EPO-0  | EPO-3   | Aranesp |
|------------------|----------|--------|---------|---------|
| AUClast          | h*mlU/ml | 31739  | 306072  | 178661  |
| CL <sup>^</sup>  | ml/h/kg  | 1,1152 | 0,2188  | 0,1207  |
| Ke               | 1/h      | 0,157  | 0,0529  | 0,0639  |
| t <sub>1/2</sub> | h        | 4,4139 | 13,1141 | 10,84   |
| C <sub>máx</sub> | mlU/ml   | 10766  | 16466   | 13266   |
| T <sub>máx</sub> | H        | 0,25   | 0,25    | 0,25    |
| Vdz              | ml/kg    | 7,1017 | 4,1394  | 1,8877  |

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

## 5 CONCLUSIÓN

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

10

### EJEMPLO 7

#### Generación de construcciones de hGH

## 15 MATERIALES Y MÉTODOS

Se sintetizaron cuatro clones de hGH (variantes de proteína de 20 kD). Se ligaron fragmentos Xba I -Not I que contenían secuencias de hGH de las cuatro variantes en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr previamente digerido con Xba I -NotI. Se preparó ADN de los 4 clones (401-0, 1, 2, 3 y 4). También se sintetizó otro clon de hGH parcial (1-242 pb) de la proteína de 22 kD (0606114). Se pidieron cebadores de Sigma-Genosys. Las secuencias de cebadores usadas para generar los polipéptidos de hGH-CTP de la presente invención se resumen en la Tabla 8, a continuación en el presente documento.

**Tabla 8**

| Número de cebador | SEQ ID NO | Secuencia                                        | Sitio de restricción (subrayado en la secuencia) |
|-------------------|-----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 25                | 27        | 5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3'                | XbaI                                             |
| 32 <sup>R</sup>   | 28        | 5' ACAGGGAGGTCTGGGGTTCTGCA 3'                    |                                                  |
| 33                | 29        | 5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'                 |                                                  |
| 4 <sup>R</sup>    | 30        | 5' CCAAACATCATCAATGTATCTTA 3'                    |                                                  |
| 25                | 31        | 5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'                        | XbaI                                             |
| 35 <sup>R</sup>   | 32        | 5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'                  |                                                  |
| 34                | 33        | 5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTCCG 3'                 |                                                  |
| 37 <sup>R</sup>   | 34        | 5' ACGCGGCCGCATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'          | NotI                                             |
| 39 <sup>R</sup>   | 35        | 5' <u>GCGGCCGCGG</u> ACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCCC 3' |                                                  |

25

**Construcción de 402-0-p69-1 (hGH) SEQ ID NO: 36:** MOD-4020 es la hormona del crecimiento humana recombinante de tipo silvestre (sin CTP) que se preparó para su uso como control en los experimentos descritos a continuación.

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

La segunda reacción se realizó con el cebador 33 y el cebador 4<sup>R</sup> y ADN plasmídico de 401-0-p57-2 como un molde; 35 como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 542 pb.

La última reacción se realizó con los cebadores 25 y 4<sup>R</sup> y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 705 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento Xba I -NotI que contenía la secuencia de 40 hGH-0 se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr. El vector se transfeció en células CHO DG-44. Las células se cultivaron en medio sin proteínas.

**Construcción de 402-1-p83-5 (hGH-CTP) - SEQ ID NO: 37 y 402-2-p72-3(hGH-CTPx2) - SEQ ID NO: 38:** MOD-4021 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 1 copia del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP de MOD-4021 se unió con el extremo C 45 terminal (un casete). MOD-4022 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 2 copias

del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los dos casetes de CTP de MOD-4022 se unieron con el extremo C terminal (dos casetes).

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

MOD-4021 y MOD-4022 se expresaron en células CHO DG-44. Las células se cultivaron en medio sin proteínas. El peso molecular de MOD-4021 es ~30,5 Kd ya que hGH tiene un PM de 22 Kd mientras que cada "casete de CTP" contribuye a 8,5 Kd con respecto al peso molecular total (véase la figura 10). El peso molecular de MOD-4021 es ~39 Kd (véase la figura 10).

**Construcción de 402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO: 39 y 402-4-p82-9(CTP\*hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO: 40:** MOD-4023 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 3 copias del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los tres casetes de CTP de MOD-4023 se unieron tanto con el extremo N terminal (un casete) como con el extremo C (dos casetes). MOD-4024 es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusiona con 1 copia truncada y 2 completas del péptido C terminal de la cadena beta de la Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP truncado de MOD-4024 se unió con el extremo N y dos casetes de CTP se unieron con el extremo C (dos casetes).

Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 25 y el cebador 35<sup>R</sup> y ADN plasmídico de p401-3-p12-5 o 401-4-p22-1 como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 265 o 220 pb. La segunda reacción se realizó con el cebador 34 y el cebador 37<sup>R</sup> y ADN plasmídico de TA-hGH-2-q65-1 como molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 695 pb. La última reacción se realizó con los cebadores 25 y 37<sup>R</sup> y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como un molde; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 938 o 891 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento Xba I -Not I que contenía una secuencia hGH en este vector de expresión eucariota pCI-dhfr.

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

**Construcción de 402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP) - SEQ ID NO: 41:** Se realizó la construcción de hGH-6 de la misma manera que la construcción de hGH-3. Se usó pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp) como un molde en la segunda reacción de PCR.

**Construcción de 402-5-p96-4 (CTP-hGH) - SEQ ID NO: 42:** La reacción por PCR se realizó usando el cebador 25 y el cebador 39<sup>R</sup> y el plásmido de ADN de pCI-dhfr- ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8) como un molde; como resultado de una amplificación por PCR, se formó un producto de 763 pb y se ligó con el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento Xba I -Not I que contenía una secuencia de ctp-hGH en este vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 402-5-p96-4.

## EJEMPLO 8

### Ensayos de bioactividad in vivo de polipéptidos hGH-CTP de la presente invención

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas hipofisectomizadas hembras (60 -100 g) recibieron una inyección S.C. semanal de 21,7 µg de polipéptidos de hGH-CTP o una inyección S.C. de 5 µg al día una vez de rhGH comercial de control.

Se midió el peso en todos los animales antes del tratamiento, 24 horas después de la primera inyección y después cada dos días hasta el final del estudio el día 21. Cada punto representa el porcentaje de aumento de peso medio del grupo ((Peso el día 0-peso el último día)/Peso el día 0). El aumento de peso medio se normalizó frente a inyección una vez al día de hGH comercial. El programa de tratamiento se resume en la Tabla 9.

Tabla 9

| N.º | Fármaco                      | N | Ruta | Programa de tratamiento | Dosis equimolar ( $\mu\text{g/rata}$ ) | Dosificación acumulada ( $\mu\text{g/rata}$ ) | Vol. de dosis (ml) |
|-----|------------------------------|---|------|-------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|
| 1   | Vehículo                     | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | NA                                     | NA                                            | 0,25               |
| 2   | Mock                         | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | NA                                     | NA                                            | 0,25               |
| 3   | MOD-4020<br>SEQ ID NO:<br>36 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | 21,7                                   | 65                                            | 0,25               |
| 4   | MOD-4021<br>SEQ ID NO:<br>37 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | 21,7                                   | 65                                            | 0,25               |
| 5   | MOD-4022<br>SEQ ID NO:<br>38 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | 21,7                                   | 65                                            | 0,25               |
| 6   | MOD-4023<br>SEQ ID NO:<br>39 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | 21,7                                   | 65                                            | 0,25               |
| 7   | MOD-4024<br>SEQ ID NO:<br>40 | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | 21,7                                   | 65                                            | 0,25               |
| 8   | Comercial<br>hGH v.1         | 7 | s.c. | días 1, 7 y 13; 1/S     | 21,7                                   | 65                                            | 0,25               |
| 9   | Comercial<br>hGH v.1         | 7 | s.c. | días 1-13; d/S          | 5                                      | 65                                            | 0,25               |

**RESULTADOS**

5

Los resultados se resumen en la figura 11. Estos resultados muestran que MOD-4023 (SEQ ID NO: 39) y MOD-4024 (SEQ ID NO: 40) indujeron una ganancia de peso de más del 120 % en comparación con el rhGH comercial que indujo una ganancia de peso del 100 %.

**10 CONCLUSIÓN**

3 dosis semanales (Días de inyecciones; 1, 7 y 13) de 21,7  $\mu\text{g}$  de MOD-4023 (SEQ ID NO: 39) y MOD-4024 (SEQ ID NO: 40) indujeron un aumento de peso del 30 % mayor en ratas hipofisectomizadas en comparación con las ratas a las que se inyectó rhGH comercial a la misma dosis acumulada que se administró una vez al día a una dosis de 5  $\mu\text{g}$  durante 13 días.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- 20 <110> OPKO Biologics Ltd
- <120> POLIPÉPTIDOS DE ERITROPOYETINA DE ACCIÓN PROLONGADA Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> P-9520-EP11
- 25 <150> EP 12179805.2
- <151> 05-02-2007
- <150> EP 07749922.6
- <151> 05-02-2007

<150> US 60/764.761

<151> 03-02-2006

5 <160> 47

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
245

<210> 3

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

5

10

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro  
245 250 255

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

Pro Ile Leu Pro Gln  
275

<210> 4

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

Gly Asp Arg  
385

<210> 5

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
245

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

<220>  
<223> Secuencia corta artificial

<400> 7  
aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25

<210> 8  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia corta artificial

<400> 8  
attgcggccg cgatccaga agaccttat tg 32

<210> 9  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia corta artificial

<400> 9

|    |                                                       |    |
|----|-------------------------------------------------------|----|
|    | taaattattgg ggtgtccgag ggccc                          | 25 |
| 5  | <210> 10<br><211> 32<br><212> ADN<br><213> Artificial |    |
| 10 | <220><br><223> Secuencia corta artificial             |    |
|    | <400> 10<br>ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at       | 32 |
| 15 | <210> 11<br><211> 35<br><212> ADN<br><213> Artificial |    |
| 20 | <220><br><223> Secuencia corta artificial             |    |
|    | <400> 11<br>tgcggccgcg gatccttatc tgcccctgt cctgc     | 35 |
| 25 | <210> 12<br><211> 17<br><212> ADN<br><213> Artificial |    |
| 30 | <220><br><223> Secuencia corta artificial             |    |
| 35 | <400> 12<br>gccctgctgt cggaagc 17                     |    |
| 40 | <210> 13<br><211> 32<br><212> ADN<br><213> Artificial |    |
|    | <220><br><223> Secuencia corta artificial             |    |
| 45 | <400> 13<br>attgcggccg cggatccaga agaccttat tg        | 32 |
| 50 | <210> 14<br><211> 32<br><212> ADN<br><213> Artificial |    |
|    | <220><br><223> Secuencia corta artificial             |    |
| 55 | <400> 14<br>cttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc        | 32 |
|    | <210> 15<br><211> 24                                  |    |

<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> ¿Fue divertido? ¿Raro? Cuéntame

<400> 15  
cctgggctcc tcttctcaa aggc 24

<210> 16  
<211> 193  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
1 5 10 15  
  
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu  
20 25 30  
  
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu  
35 40 45  
  
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu  
50 55 60  
  
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg  
65 70 75 80  
  
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu  
85 90 95  
  
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser  
100 105 110  
  
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly  
115 120 125  
  
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu  
130 135 140  
  
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile  
145 150 155 160  
  
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu  
165 170 175  
  
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp  
180 185 190  
  
Arg

5 <210> 17  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia corta artificial  
 <400> 17  
 Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu  
 20 25 30  
 10 Pro Gln  
 <210> 18  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia corta artificial  
 20 <400> 18  
 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 20 25  
 <210> 19  
 <211> 27  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 30 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly  
 20 25  
 <210> 20  
 <211> 786  
 <212> ADN  
 35 <213> Homo sapiens  
 <400> 20

# ES 2 636 668 T3

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

<210> 21

<211> 873

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

5

<400> 22  
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu  
 20 25 30  
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu  
 35 40 45  
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu  
 50 55 60  
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu  
 85 90 95  
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Ser Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser  
 100 105 110  
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly  
 115 120 125  
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu  
 130 135 140  
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu  
 165 170 175  
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp  
 180 185 190  
 Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser  
 195 200 205  
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 210 215 220

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

10

# ES 2 636 668 T3

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
210 215

<210> 24

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

# ES 2 636 668 T3

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln  
1 5 10 15

Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln  
35 40 45

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

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr  
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
165

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

<400> 25  
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

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

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

<400> 26

# ES 2 636 668 T3

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

Thr Thr Ala Leu Ser  
20

5  
<210> 27  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

10  
<220>  
<223> Secuencia corta artificial

15  
<400> 27  
ctctagagga catggccac 19

20  
<210> 28  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial

25  
<220>  
<223> Secuencia corta artificial

30  
<400> 28  
acagggaggt ctgggggttc tgca 24

35  
<210> 29  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

40  
<220>  
<223> Secuencia corta artificial

45  
<400> 29  
tgcagaaccc ccagacctcc ctgtgc 26

50  
<210> 30  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

55  
<220>  
<223> Secuencia corta artificial

60  
<400> 30  
ccaaactcat caatgtatct ta 22

65  
<210> 31  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial

70  
<220>  
<223> Secuencia corta artificial

75  
<400> 31

|    |                                                          |    |  |
|----|----------------------------------------------------------|----|--|
|    | ctctagagga catggccac                                     | 19 |  |
| 5  | <210> 32<br><211> 25<br><212> ADN<br><213> Artificial    |    |  |
| 10 | <220><br><223> Secuencia corta artificial                |    |  |
|    | <400> 32<br>cgaactcctg gtaggtgtca aaggc                  | 25 |  |
| 15 | <210> 33<br><211> 25<br><212> ADN<br><213> Artificial    |    |  |
| 20 | <220><br><223> Secuencia corta artificial                |    |  |
|    | <400> 33<br>gccttgaca cctaccagga gttcg                   | 25 |  |
| 25 | <210> 34<br><211> 33<br><212> ADN<br><213> Artificial    |    |  |
| 30 | <220><br><223> Secuencia corta artificial                |    |  |
| 35 | <400> 34<br>acgcggccgc atccagacct tcatcactga ggc         | 33 |  |
| 40 | <210> 35<br><211> 34<br><212> ADN<br><213> Artificial    |    |  |
|    | <220><br><223> Secuencia corta artificial                |    |  |
| 45 | <400> 35<br>gcggccgcgg actcatcaga agccgcagct gccc        | 34 |  |
| 50 | <210> 36<br><211> 217<br><212> PRT<br><213> Homo sapiens |    |  |
|    | <400> 36                                                 |    |  |

# ES 2 636 668 T3

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

5 <210> 37  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 37

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Leu Pro Gln  
245

5

<210> 38  
<211> 273  
<212> PRT

# ES 2 636 668 T3

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu  
245 250 255

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

Gln

<210> 39

<211> 301

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

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

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

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

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

# ES 2 636 668 T3

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr  
 85 90 95  
 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile  
 100 105 110  
 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu  
 115 120 125  
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val  
 130 135 140  
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln  
 165 170 175  
 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile  
 180 185 190  
 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp  
 195 200 205  
 Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met  
 210 215 220  
 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu  
 245 250 255  
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro  
 260 265 270  
 Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser  
 275 280 285  
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 290 295 300

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

<400> 40

# ES 2 636 668 T3

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

# ES 2 636 668 T3

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

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

<210> 41

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 636 668 T3

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

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

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

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

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

Gln

<210> 42

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

# ES 2 636 668 T3

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val  
 130 135 140  
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln  
 165 170 175  
 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile  
 180 185 190  
 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp  
 195 200 205  
 Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met  
 210 215 220  
 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Cys Gly Phe  
 245

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

<220>  
 <223> Proteína corta artificial

<400> 43  
 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro  
 1 5 10

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

<400> 44  
 tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60  
 cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120  
 gccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180  
 catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240  
 ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300

# ES 2 636 668 T3

cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360  
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420  
ccagagctgg ctggagcccg tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta 480  
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540  
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacct 600  
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct 660  
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720  
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gccctcccc cgagcctgcc 780  
ctccccaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc 840  
tggatgcggc cgc 853

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

<400> 45  
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60  
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120  
gccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180  
catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240  
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300  
cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360  
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420  
ccagagctgg ctggagcccg tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta 480  
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540  
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacct 600  
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct 660  
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720  
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gccctcccc cgagcctgcc 780  
ctccccaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctcctc 840  
taaggccct cctccatccc tgccatcccc ctcccgctg cctggcccct ctgacacccc 900  
tactctgcct cagtgatgaa ggtctggatg cggccgc 937

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

<400> 46

# ES 2 636 668 T3

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60  
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccgagcct 120  
gcccttcccc accatcccc tgagcaggct gttcgacaac gccatgctga gggctcacag 180  
gctgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccaaagga 240  
gcagaagtac agcttcctgc agaaccacca gacctccctg tgcttcagcg agagcatccc 300  
cacccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc 360  
cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgccaa 420  
cagcctgggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga 480  
gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt 540  
caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgccc tgctgaagaa 600  
ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcctgaggat 660  
cgtgcagtgc agaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca agggccctcc 720  
cccgagcctg ccctcccaa gcaggctgcc tgggccctcc gacacaccaa tcctgccaca 780  
gagcagctcc tctaaggccc ctccctcatc cctgccatcc ccctcccggc tgcttgccc 840  
ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgatg aaggtctgga tgcggccgc 889

<210> 47

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

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

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

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

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

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

ES 2 636 668 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 85  |     |     |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |  |  |
| Ser | Asn | Leu | Glu | Leu | Leu | Arg | Ile | Ser | Leu | Leu | Leu | Ile | Gln | Ser | Trp |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |
| Leu | Glu | Pro | Val | Gln | Phe | Leu | Arg | Ser | Val | Phe | Ala | Asn | Ser | Leu | Val |  |  |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |  |  |
| Tyr | Gly | Ala | Ser | Asp | Ser | Asn | Val | Tyr | Asp | Leu | Leu | Lys | Asp | Leu | Glu |  |  |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |  |  |
| Glu | Gly | Ile | Gln | Thr | Leu | Met | Gly | Arg | Leu | Glu | Asp | Gly | Ser | Pro | Arg |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Thr | Gly | Gln | Ile | Phe | Lys | Gln | Thr | Tyr | Ser | Lys | Phe | Asp | Thr | Asn | Ser |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| His | Asn | Asp | Asp | Ala | Leu | Leu | Lys | Asn | Tyr | Gly | Leu | Leu | Tyr | Cys | Phe |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Arg | Lys | Asp | Met | Asp | Lys | Val | Glu | Thr | Phe | Leu | Arg | Ile | Val | Gln | Cys |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Arg | Ser | Val | Glu | Gly | Ser | Cys | Gly | Phe |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido modificado por CTP que consiste en una eritropoyetina (EPO), y tres CTP, en el que dichos CTP son péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana, en el que el primer CTP está unido al extremo amino de dicha EPO, y el segundo y el tercer CTP están unidos al extremo carboxi de dicha EPO, en el que dichos CTP comprenden la secuencia aminoacídica SSSSKAPPPS, en el que dicha EPO carece de un péptido señal, y en el que la secuencia aminoacídica de dicho polipéptido modificado por CTP comprende la secuencia de aminoácidos 28-277 de SEQ ID NO: 3 o los aminoácidos 28-249 de la SEQ ID NO: 6.
2. El polipéptido modificado por CTP de la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.
3. El polipéptido modificado por CTP de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o reducción de la incidencia de anemia.
4. Un polipéptido modificado por CTP que consiste en una eritropoyetina (EPO), y tres CTP, en el que dichos CTP son péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana, en el que el primer CTP está unido al extremo amino de dicha EPO, y el segundo y el tercer CTP están unidos al extremo carboxi de dicha EPO, para su uso en la estimulación de la eritropoyesis, la mejora de los niveles de hemoglobina, o una combinación de las mismas, en el que dichos CTP comprenden la secuencia aminoacídica SSSSKAPPPS, y en el que dicho polipéptido modificado por CTP estimula la eritropoyesis.
5. El polipéptido modificado por CTP de la reivindicación 1, o el polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la secuencia de al menos uno de dichos tres CTP comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18.
6. El polipéptido modificado por CTP de la reivindicación 1, o el polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que al menos uno de dichos tres CTP está truncado, y en el que dicho CTP truncado comprende al menos un sitio de glucosilación.
7. El polipéptido modificado por CTP de cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 6, o el polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que dicha EPO está glucosilada.
8. El polipéptido modificado por CTP de cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 o 6, o el polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que dicha EPO no está glucosilada.
9. El polipéptido modificado por CTP de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-8, o el polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que al menos uno de dichos tres CTP está glucosilado.
10. El polipéptido modificado por CTP de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5-9, o el polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en el que al menos uno de dichos tres CTP está unido a dicha EPO a través de un enlazador.
11. El polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, o para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5-10 cuando dependen de la reivindicación 4, en el que la secuencia aminoacídica de dicho polipéptido comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de las secuencias expuestas en los aminoácidos 28-277 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 28-249 de la SEQ ID NO: 6, los aminoácidos 1-277 de la SEQ ID NO: 3 y los aminoácidos 1-249 de la SEQ ID NO: 6.
12. El polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, o para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5-11 cuando dependen de la reivindicación 4, en el que dicha EPO carece de un péptido señal.
13. El polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, o para su uso de

acuerdo con las reivindicaciones 5-11 cuando dependen de la reivindicación 4, que comprende además un péptido señal.

14. El polipéptido modificado por CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho  
5 péptido señal está codificado por la SEQ ID NO: 19.

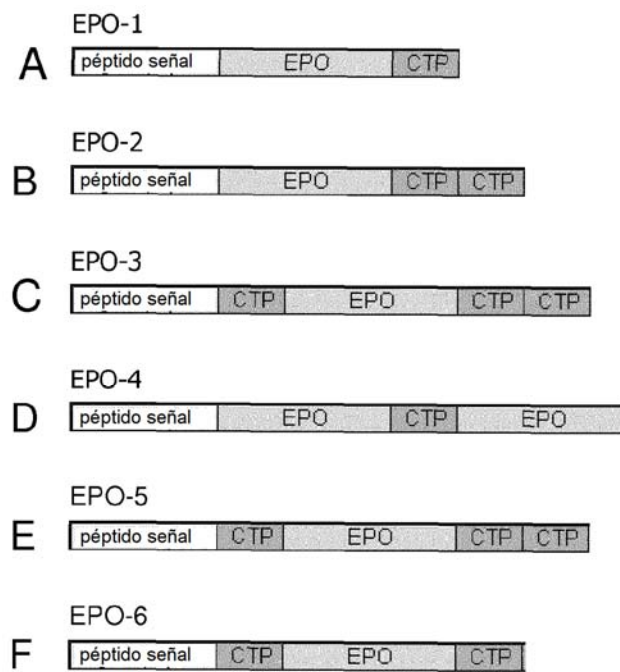
15. Una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido modificado por CTP como se define en  
cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que dicha formulación comprende además un tampón, tal como un  
tampón citrato o acetato, y un agente de tonicidad, tal como cloruro sódico.  
10

16. La formulación farmacéutica de la reivindicación 15, en la que dicha formulación se formula para su  
inyección en un recipiente multidosis, opcionalmente con un conservante, tal como cloruro de benzalconio o  
timerosal.

15 17. La formulación farmacéutica de la reivindicación 15 o 16, en la que dicha formulación es una  
formulación líquida.

18. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 15-17, para su uso como un  
medicamento.  
20

19. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 15-17, para su uso en el tratamiento  
o reducción de la incidencia de anemia, para estimular la eritropoyesis, o para mejorar los niveles de hemoglobina, o  
cualquier combinación de los mismos, en un sujeto.



FIGURAS 1A-F

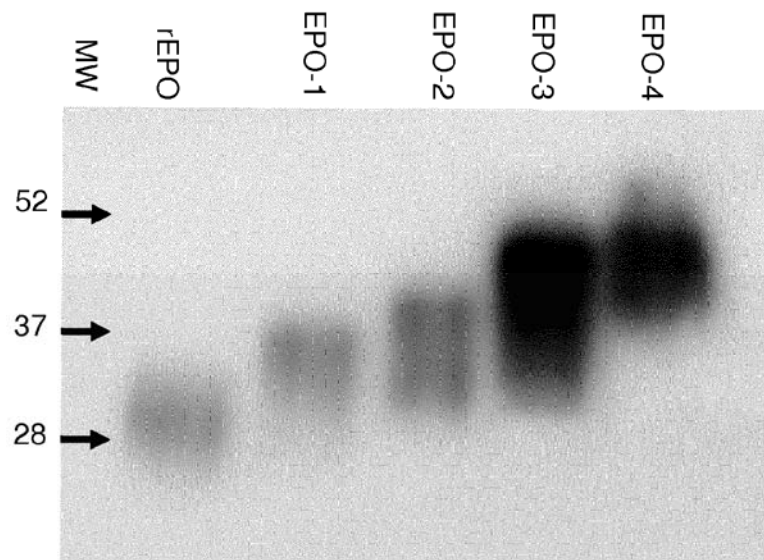


FIGURA 2

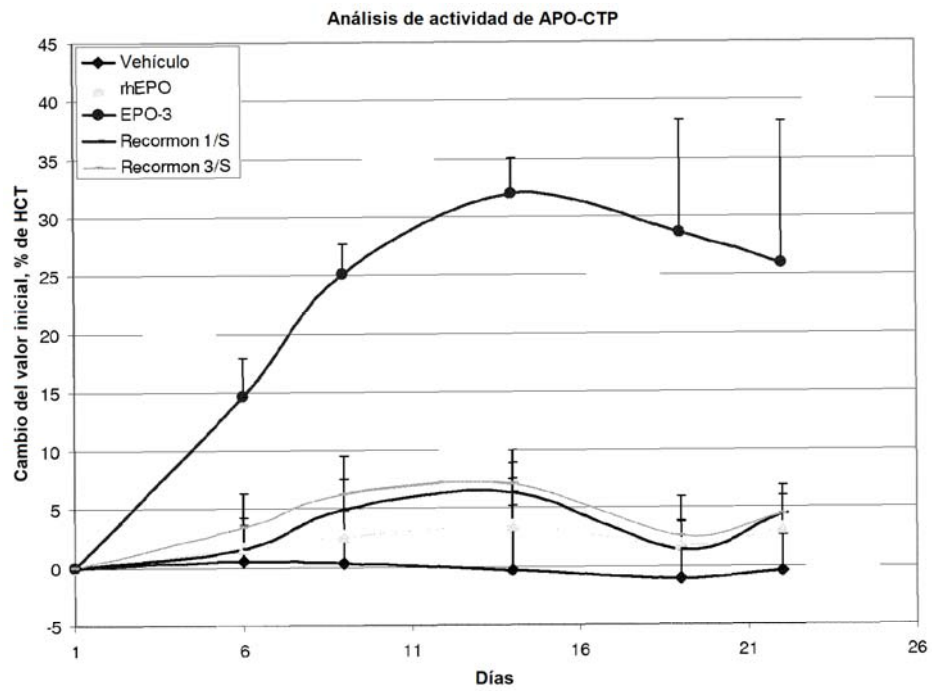


FIGURA 3

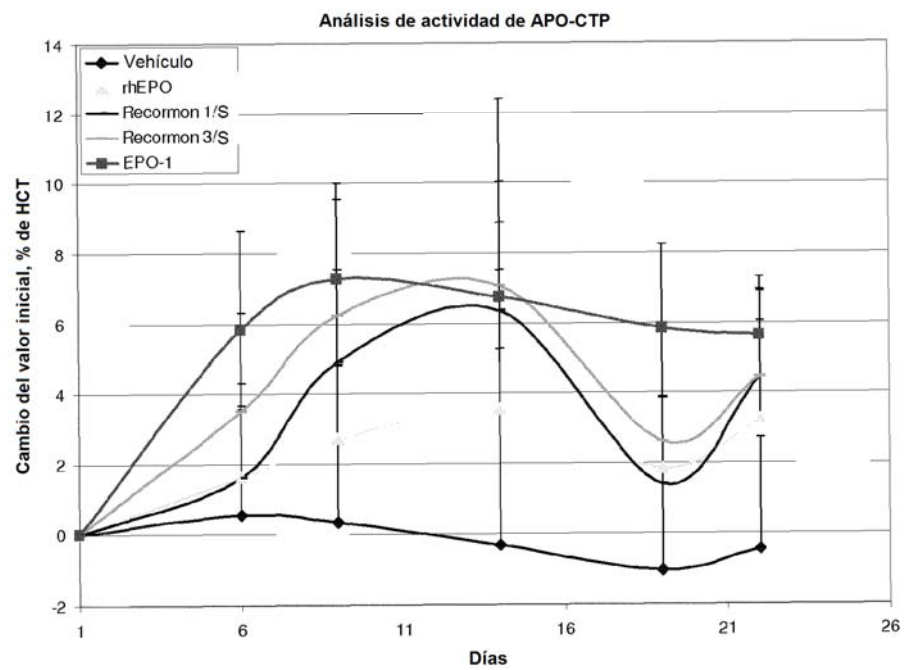


FIGURA 4

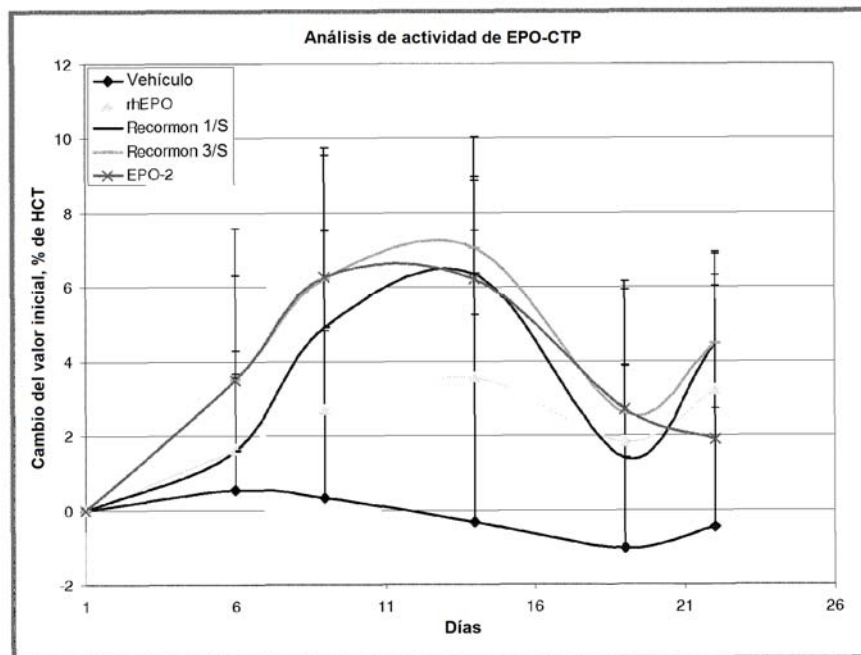


FIGURA 5

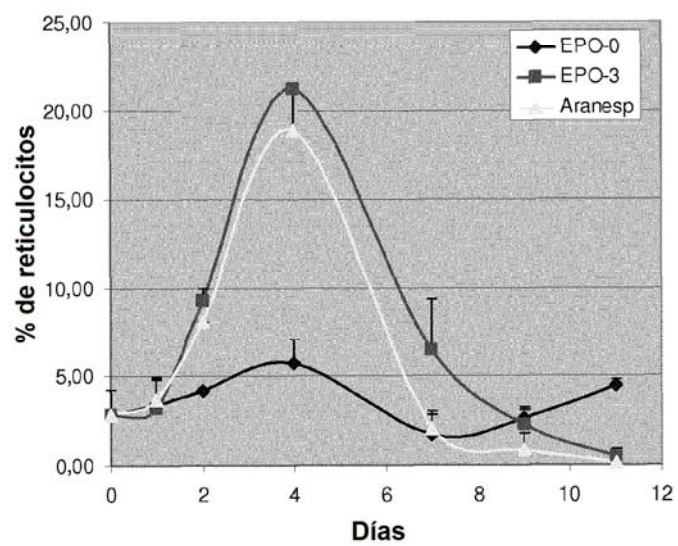


FIGURA 6

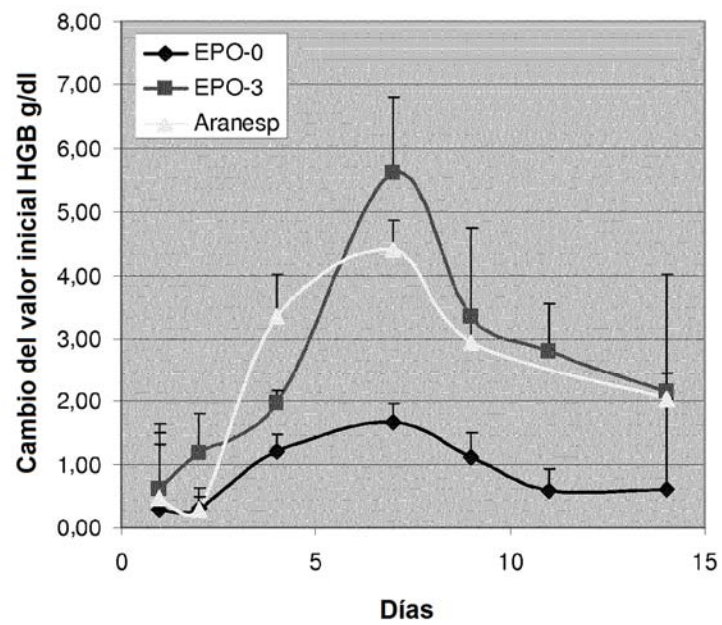


FIGURA 7

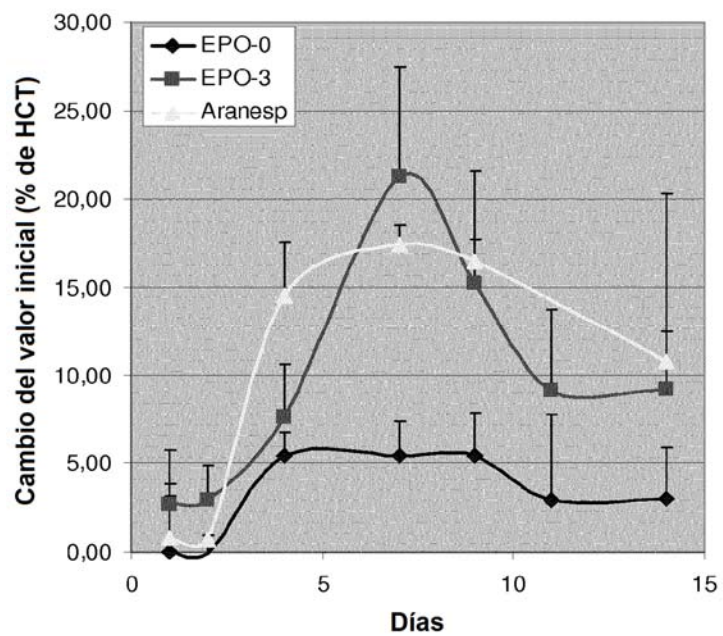


FIGURA 8

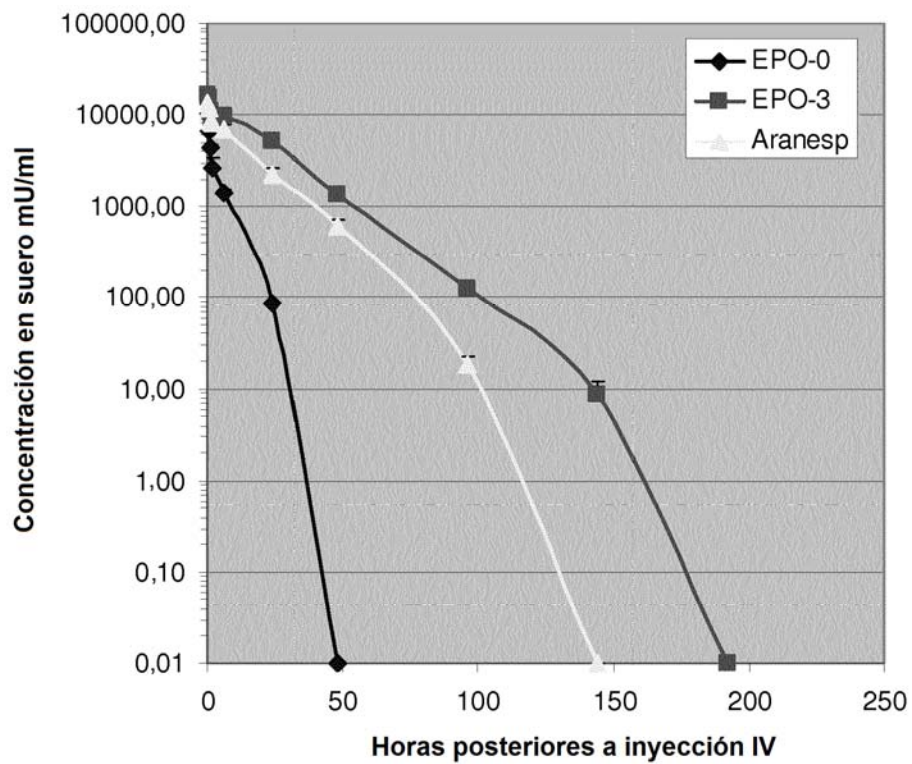


FIGURA 9

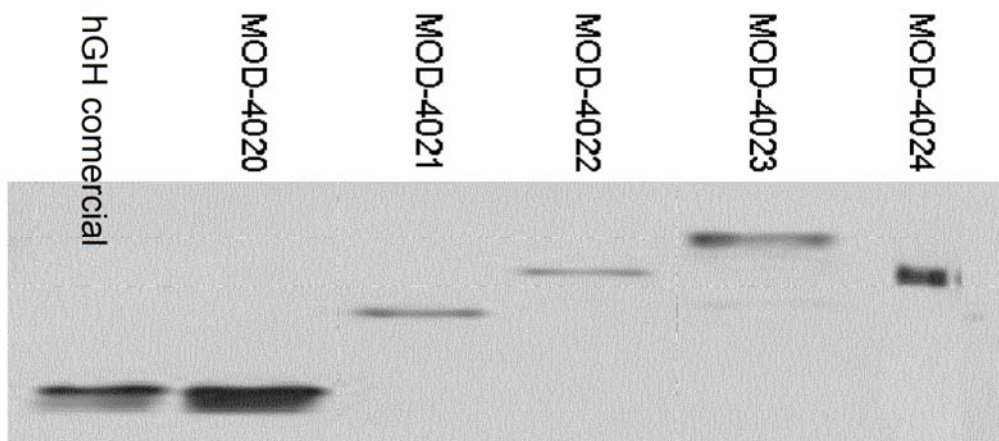


FIGURA 10

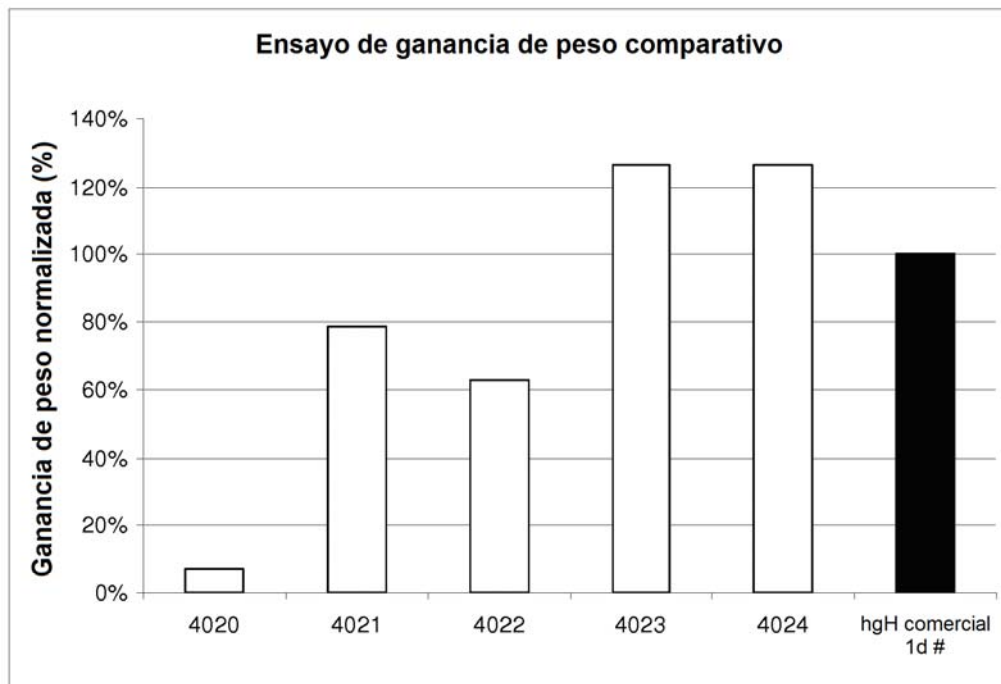


FIGURA 11