

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 365**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

C07K 14/59 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2007** **E 14196333 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** **EP 2853541**

54 Título: **Polipéptidos de acción prolongada y usos de estos**

30 Prioridad:

03.02.2006 US 764761 P

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

12.04.2018

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:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 663 365 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de acción prolongada y usos de estos

5 Campo de la invención

Se describen un polipéptido y polinucleótidos que codifican al mismo que comprende al menos dos péptidos carboxiterminal (CTP) de la gonadotropina coriónica unidos a un péptido de interés. Además se describen composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido y los polinucleótidos de la invención y los métodos de uso 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. En consecuencia, los polipéptidos tienen, típicamente, vida media corta en circulación de varias horas. Debido a su baja estabilidad, los fármacos peptídicos se suministran usualmente con una frecuencia sostenida para mantener una concentración eficaz en plasma del péptido activo. Además, ya que los fármacos peptídicos se administran usualmente mediante infusión, la inyección frecuente de fármacos peptídicos provoca malestar considerable a un sujeto. Por lo tanto, existe una necesidad de tecnologías que prolonguen la vida media de los polipéptidos terapéuticos mientras que se mantenga una alta eficacia farmacológica de estos. Tales fármacos peptídicos deseados deben cumplir, además, con los requisitos de estabilidad mejorada en suero, alta actividad y una baja probabilidad de inducir respuesta inmunitaria no deseada cuando se inyecten en un sujeto.

15

Las farmacocinéticas desfavorables, tal como una vida media corta en suero, pueden evitar el desarrollo farmacéutico de muchos candidatos farmacéuticos prometedores. La vida media en suero es una característica empírica de una molécula, y debe determinarse experimentalmente para cada fármaco potencial nuevo. Por ejemplo, con fármacos polipeptídicos de peso molecular muy bajo, los mecanismos fisiológicos de aclaramiento tal como la filtración renal pueden hacer no viable el mantenimiento de niveles terapéuticos de un fármaco debido al costo o la frecuencia del régimen de dosificación necesario. A la inversa, no es deseable una vida media larga en suero cuando un fármaco o sus metabolitos tienen efectos secundarios tóxicos.

25

La patente de los Estados Unidos núm. 5.759.818 otorgada a Boime describe proteínas modificadas en donde la modificación comprende la extensión del amino terminal de la proteína con la secuencia de aminoácidos de la porción carboxi terminal (CTP) de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana.

35

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido modificado con CTP que comprende un péptido de interferón beta 1 (IFN β 1) y dos péptidos carboxi terminal de la gonadotropina coriónica, en donde el primer péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al amino terminal del péptido de IFN β 1, y el segundo péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al carboxi terminal del péptido de IFN β 1, en donde el péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, y en donde el péptido de IFN β 1 muestra actividad de interferón.

40

45 En una modalidad, el péptido de IFN β 1 se glicosila.

En otra modalidad, el péptido de IFN β 1 no se glicosila.

En una modalidad, el péptido de IFN β 1 comprende la secuencia de aminoácidos en la Base de Datos de NCBI con núm. de Acceso NP_002167.1 o en la sec. con núm. de ident.: 24.

50

En una modalidad, al menos un péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 17 o la sec. con núm. de ident.: 18.

En una modalidad, la secuencia de cada péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 17, el IFN β 1 es la forma madura del IFN β 1 que carece de un péptido señal, y el residuo de cisteína en la posición 17 del IFN β 1 se sustituye por un residuo de serina, en donde el IFN β 1 Cys17Ser resultante tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24.

55

En una modalidad, la secuencia de cada péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica consiste en la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 18, el IFN β 1 es la forma madura del IFN β 1 que carece de un péptido señal, y el residuo de cisteína en la posición 17 del IFN β 1 se sustituye con un residuo de serina, en donde el IFN β 1 Cys17Ser resultante tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24.

60

65 En una modalidad, al menos un péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se glicosila.

En una modalidad, el polipéptido comprende, además, un péptido señal que es N-terminal a la secuencia de CTP que es a su vez N-terminal al péptido de IFN β 1.

5 En una modalidad, el al menos un péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al péptido de IFN β 1 mediante un enlace peptídico.

La presente invención proporciona, además, un polinucleótido que codifica el polipéptido modificado con CTP, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, y una célula que comprende el vector de expresión. La presente invención proporciona, además, una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido modificado con CTP, o que comprende el polinucleótido, o el vector de expresión o la célula.

10 En una modalidad, la formulación farmacéutica comprende, además, un amortiguador, tal como un amortiguador de citrato o acetato, y un agente de tonicidad, tal como cloruro sódico. En una modalidad, la formulación farmacéutica se formula para inyección en un recipiente multidosis, y opcionalmente, con un conservante, tal como cloruro de benzalconio o timerosal. En una modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación líquida, en donde, opcionalmente, la formulación líquida se encuentra a un pH entre aproximadamente 6 a 7.

15 La presente invención proporciona, además, el polipéptido modificado con CTP, el polinucleótido, o la formulación farmacéutica para el uso como un medicamento.

20 La presente invención proporciona, además, el polipéptido modificado con CTP, el polinucleótido, o la formulación farmacéutica para el uso en el tratamiento de una afección viral o proliferativa en un sujeto. En una modalidad, la afección proliferativa es un melanoma maligno.

25 La presente invención proporciona, además, un método para mejorar la vida media biológica de un péptido de IFN β 1, que comprende la etapa de unir un primer péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica al amino terminal del péptido de IFN β 1 y un segundo péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica al carboxi terminal del péptido de IFN β 1, lo que forma de esta manera un polipéptido de IFN β 1 modificado con CTP, en donde el péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, y en donde se mejora la vida media biológica del IFN β 1 en el polipéptido de IFN β 1 modificado.

30 La presente invención proporciona, además, un método para producir un polipéptido de IFN β 1 modificado con CTP en una célula aislada, el método que comprende la etapa de transfectar la célula con un vector de expresión que comprende una porción codificante que codifica un polipéptido de IFN β 1 y dos péptidos carboxi terminal de la gonadotropina coriónica, en donde el primer péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al amino terminal del péptido de IFN β 1, y el segundo péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al carboxi terminal del péptido de IFN β 1, en donde el péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, lo que produce de esta manera un IFN β 1 modificado con CTP en una célula aislada.

Breve descripción de los dibujos

45 Las figuras 1A-1F son diagramas que ilustran seis constructos de EPO-CTP.

La Figura 1A - es un diagrama del polipéptido de la sec. con núm. de ident.: 1

La Figura 1B es un diagrama del polipéptido de la sec. con núm. de ident.: 2

50 La Figura 1C es un diagrama del polipéptido de la sec. con núm. de ident.: 3

La Figura 1D es un diagrama del polipéptido de la sec. con núm. de ident.: 4.

55 La Figura 1E es un diagrama del polipéptido de la sec. con núm. de ident.: 5.

La Figura 1F es un diagrama del polipéptido de la sec. con núm. de ident.: 6.

60 La Figura 2 es una fotografía que ilustra la expresión de las variantes de EPO-CTP a partir de células DG44 transfectadas. Las muestras finales de prueba a partir de las células transfectadas se prepararon como se describe en "preparación de muestra" y se corrieron en SDS/PAGE. Las proteínas se detectaron mediante transferencia western.

65 La Figura 3 es un gráfico que ilustra la bioactividad in vivo de los derivados hEPO recombinantes y de EPO-3 (sec. con núm. de ident.: 3). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 μ g/kg) durante tres semanas de EPO-3, rhEPO-WT (sec. con núm. de ident.: 16), Recormon (EPO comercial) o Recormon (5 μ g/kg) 3 veces a la semana. Los animales control se inyectaron IV con PBS. Las muestras de sangre se recolectaron tres

veces a la semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa el promedio de hematocrito por grupo (%) \pm SE.

La Figura 4 es un gráfico que ilustra la bioactividad in vivo de derivados hEPO recombinantes y de EPO-1 (sec. con núm. de ident.: 1). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 μ g/kg) durante tres semanas de EPO-1, rhEPO-WT (sec. con núm. de ident.: 16), Recormon o Recormon (5 μ g/kg) 3 veces a la semana. Los animales control se inyectaron IV con PBS. Las muestras de sangre se recolectaron tres veces a la semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa el promedio de hematocrito por grupo (%) \pm SE.

La Figura 5 es un gráfico que ilustra la bioactividad in vivo de derivados hEPO recombinantes y de EPO-2 (sec. con núm. de ident.: 2). Los ratones ICR (n=7/grupo) recibieron una única inyección IV/semana (15 μ g/kg) durante tres semanas de EPO-2 (sec. con núm. de ident.: 2), rhEPO-WT (sec. con núm. de ident.: 16), Recormon o Recormon (5 μ g/kg) 3 veces a la semana. Los animales control se inyectaron IV con PBS. Las muestras de sangre se recolectaron tres veces a la semana y se detectaron los niveles de hematocrito. Cada punto representa el promedio de hematocrito por grupo (%) \pm SE.

La Figura 6 es un gráfico de tiempo que ilustra el cambio en el nivel de reticulocitos después de una única dosis en bolo de EP0-0 (sec. con núm. de ident.: 16), EPO-3 (sec. con núm. de ident.: 3) y Aranesp.

La Figura 7 es un gráfico de tiempo que ilustra el cambio en el nivel de hemoglobina (presentado como cambio con respecto al valor inicial) después de una única dosis en bolo de EP0-0 (sec. con núm. de ident.: 16), EPO-3 (sec. con núm. de ident.: 3) y Aranesp.

La Figura 8 es un gráfico de tiempo que ilustra el cambio en el nivel de hematocrito después de una única dosis en bolo de EP0-0 (sec. con núm. de ident.: 16), EPO-3 (sec. con núm. de ident.: 3) y Aranesp.

La Figura 9 es un gráfico que ilustra el cambio en la concentración en suero de EPO -0 (sec. con núm. de ident.: 16), EPO-3 (sec. con núm. de ident.: 3) y Aranesp después de la inyección i.v.

La Figura 10 es una transferencia Western que ilustra el peso molecular y la identidad de MOD-4020 (sec. con núm. de ident.: 36), MOD-4021 (sec. con núm. de ident.: 37), MOD-4022 (sec. con núm. de ident.: 38), MOD-4023 (sec. con núm. de ident.: 39) y MOD-4024 (sec. con núm. de ident.: 40). El gel de PAGE SDS se transfirió y se tiñó mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-hGH. La fotografía indica que al igual que la hGH comercial y silvestre, las variantes MOD-7020-4 son reconocidas por anticuerpos anti hGH.

La Figura 11 es un gráfico de barras que ilustra la ganancia de peso de ratas sometidas a hipofisectomía después de la administración de los polipéptidos de GH-CTP de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe péptidos de acción prolongada y métodos para para la producción y uso de los mismos. Los péptidos de acción prolongada comprenden el péptido carboxi terminal (CTP) de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG). En una modalidad, el CTP actúa como un protector frente a la degradación de proteínas o péptidos derivados de esta. En una modalidad, el CTP aumenta la vida media en circulación de las proteínas o péptidos derivados de estas. En algunas modalidades, el CTP mejora la potencia de las proteínas o péptidos derivados de estas.

Los términos "péptido de CTP," "péptido carboxi terminal," y "secuencia de CTP" se usan indistintamente en la presente descripción. En otra modalidad, el péptido carboxi terminal es un CTP en toda su longitud. En otra modalidad, el péptido carboxi terminal en un CTP truncado.

En otra modalidad, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan indistintamente en la presente descripción. En otra modalidad, "secuencia" cuando se hace referencia a un polinucleótido puede referirse a una porción codificante.

En otra modalidad, "péptido de interés" y "secuencia polipeptídica de interés" se usan indistintamente en la presente descripción. En otra modalidad, el péptido de interés es una proteína en toda su longitud. En otra modalidad, el péptido de interés es un fragmento de proteína.

En una modalidad, se proporciona un polipéptido que comprende dos secuencias de péptido carboxi terminal (CTP) de la gonadotropina coriónica unida a una secuencia polipeptídica de interés, en donde una primer secuencia de CTP de las dos secuencias de CTP se une al amino terminal de la secuencia polipeptídica de interés y la segunda secuencia de CTP de las dos secuencias de CTP se une al carboxi terminal de la secuencia polipeptídica de interés. En otra modalidad, la secuencia de péptido carboxi terminal (CTP) es de la gonadotropina coriónica humana.

En otra modalidad, el péptido carboxi terminal (CTP) se une a la secuencia polipeptídica de interés mediante un

conector. En otra modalidad, el conector que conecta la secuencia de CTP a la secuencia polipeptídica de interés es un enlace covalente. En otra modalidad, el conector que conecta la secuencia de CTP a la secuencia polipeptídica de interés es un enlace peptídico. En otra modalidad, el conector que conecta la secuencia de CTP a la secuencia polipeptídica de interés es un enlace peptídico sustituido.

5 En esta invención, la frase "secuencia polipeptídica de interés" se refiere a los polipéptidos de interferón beta 1 (IFN β 1). En otra modalidad, el péptido se glicosila. En otra modalidad, el péptido no se glicosila.

10 En esta invención, el péptido carboxi terminal (CTP) de la Gonadotropina Coriónica humana (hCG) se fusiona con una proteína interferón beta 1.

15 Se describe en la presente descripción que las secuencias de CTP tanto en el extremo amino terminal de un polipéptido como en el extremo carboxi terminal del polipéptido proporcionan una mejor protección frente a la degradación de una proteína. En algunas modalidades, las secuencias de CTP tanto en el extremo amino terminal de un polipéptido como en el extremo carboxi terminal del polipéptido proporcionan un aumento de la vida media de la proteína unida.

20 Se describe, además, en la presente descripción que una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en serie a la secuencia de CTP en el carboxi terminal proporcionan una mejor protección frente a la degradación de una proteína. En algunas modalidades, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en serie a la secuencia de CTP en el carboxi terminal proporcionan un aumento de la vida media de la proteína unida. En algunas modalidades, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en serie a la secuencia de CTP en el carboxi terminal proporcionan una mejor actividad de la proteína unida.

30 Se describe, además, en la presente descripción que una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en serie a la secuencia de CTP en el amino terminal proporcionan una mejor protección frente a la degradación de la proteína unida. En algunas modalidades, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en serie a la secuencia de CTP en el amino terminal proporcionan un aumento de la vida media de la proteína unida. En algunas modalidades, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal del polipéptido, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en serie a la secuencia de CTP en el amino terminal proporcionan una mejor actividad de la proteína unida.

40 En otra modalidad, el péptido del péptido carboxi terminal (CTP) de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos (AA) desde el AA 112 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se expone en la sec. con núm. de ident.: 17. En otra modalidad, la secuencia de CTP de la presente invención comprende la secuencia de AA desde el AA 118 a la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana, como se expone en la sec. con núm. de ident.: 18. En otra modalidad, la secuencia de CTP comienza, además, desde cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 de la gonadotropina coriónica humana. En algunas modalidades, el péptido de la secuencia de CTP es de 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 AA de largo y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia de AA de CTP.

50 En otra modalidad, el péptido de CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 1-5 sustituciones conservadoras de AA como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 5.712.122. En otra modalidad, el péptido de CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 1 sustitución conservadora de AA. En otra modalidad, el péptido de CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 2 sustituciones conservadoras de AA. En otra modalidad, el péptido de CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 3 sustituciones conservadoras de AA. En otra modalidad, el péptido de CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 4 sustituciones conservadoras de AA. En otra modalidad, el péptido de CTP es una variante del CTP de la gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 5 sustituciones conservadoras de AA. En otra modalidad, la secuencia de AA del péptido de CTP de la presente invención es al menos 70 % homóloga a la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de este. En otra modalidad, la secuencia de AA del péptido de CTP de la presente invención es al menos 80 % homóloga a la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de este. En otra modalidad, la secuencia de AA del péptido de CTP de la presente invención es al menos 90 % homóloga a la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de este. En otra modalidad, la secuencia de AA del péptido de CTP de la presente invención es al menos 95 % homóloga a la secuencia de AA del CTP nativo o un péptido de este.

65 En otra modalidad, la secuencia de ADN del péptido de CTP de la presente invención es al menos 70 % homóloga a la secuencia de ADN de CTP nativo o un péptido de este. En otra modalidad, la secuencia de ADN del péptido de

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

En otra modalidad, al menos una de las secuencias de AA del CTP de la gonadotropina coriónica se trunca. En otra modalidad, ambas secuencias de AA del CTP de la gonadotropina coriónica se truncan. El CTP truncado comprende los primeros 10 AA de la sec. con núm. de ident.:43, es decir, SSSSKAPPPS. En otra modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 11 AA de la sec. con núm. de ident.:43. En otra modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 12 AA de la sec. con núm. de ident.:43. En otra modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 13 AA de la sec. con núm. de ident.:43. En otra modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 14 AA de la sec. con núm. de ident.:43. En otra modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 15 AA de la sec. con núm. de ident.:43. En otra modalidad, el CTP truncado comprende los primeros 16 AA de la sec. con núm. de ident.:43. En otra modalidad, el CTP truncado comprende los últimos 14 AA de la sec. con núm. de ident.:43.

En otra modalidad, al menos una de las secuencias de AA del CTP de la gonadotropina coriónica se glicosila. En otra modalidad, ambas secuencias de AA del CTP de la gonadotropina coriónica se glicosilan. En otra modalidad, la secuencia de CTP de la presente invención comprende al menos un sitio de glicosilación. En otra modalidad, la secuencia de CTP de la presente invención comprende 2 sitios de glicosilación. En otra modalidad, la secuencia de CTP de la presente invención comprende 3 sitios de glicosilación. En otra modalidad, la secuencia de CTP de la presente invención comprende 4 sitios de glicosilación.

Se describe en la presente descripción que puede utilizarse la eritropoyetina (EPO) de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción. Se describe que la unión de la secuencia de CTP tanto al amino como al carboxi terminal de la proteína EPO da como resultado un aumento en la potencia para estimular la eritropoyesis (Figuras 3-5) y (Tabla 6 del Ejemplo 4), en comparación con la EPO recombinante y otras combinaciones de EPO y CTP. Se describe que una EPO unida a tres secuencias de CTP no afecta la unión a su receptor como se evidencia en la Tabla 4 del Ejemplo 3 lo que demuestra que la EPO unida a tres secuencias de CTP es igualmente eficaz en estimular la proliferación de células TF-1 como la EPO silvestre.

En algunas modalidades, la homología de acuerdo con la presente invención abarca además delecciones, inserciones, o variantes de sustitución, que incluyen una sustitución de AA, de estas y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de estas.

Se describe en la presente descripción que puede utilizarse la hormona de crecimiento humana (hGH) de acuerdo con las enseñanzas en la presente descripción. Se describe que la unión de la secuencia de CTP tanto al amino como al carboxi terminal de la proteína hGH da como resultado un aumento de la potencia (Figuras 11). Se describe además que la unión de la secuencia de CTP tanto al amino como al carboxi terminal de la proteína hGH da como resultado una actividad prolongada in vivo.

El interferón beta 1 (IFN β 1) se utiliza de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. En algunas modalidades, la unión de la secuencia de CTP tanto al amino como al carboxi terminal de la proteína interferón beta-1 da como resultado un aumento en la potencia. En algunas modalidades, la unión de la secuencia de CTP tanto al amino como al carboxi terminal de la proteína interferón beta 1 da como resultado una actividad prolongada in vivo.

En esta invención, "interferón" se refiere al polipéptido interferón beta 1 de mamífero. En algunas modalidades, el interferón es una subespecie de interferón. En una modalidad, la subespecie de interferón (IFN) es IFN- β 1a. En una modalidad, la subespecie de interferón (IFN) es IFN- β 1b.

En una modalidad, el interferón de la presente invención muestra actividad de interferón, tal como actividad antiviral y antiproliferativa. En algunas modalidades, los núms. de acceso de GenBank de los ejemplos no limitantes de interferones se enumeran en la Tabla 1 más abajo.

En una modalidad, un interferón de la presente invención se refiere también a homólogos. En una modalidad, la secuencia de AA del interferón de la presente invención es al menos 50 % homóloga a las secuencias de interferón enumeradas en la Tabla 1 como se determina mediante el uso del programa informático BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de parámetros predeterminados). En una modalidad, la secuencia de AA del interferón de la presente invención es al menos 60 % homóloga a las secuencias de interferón enumeradas en la Tabla 1 como se determina mediante el uso del programa informático BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de parámetros predeterminados). En una modalidad, la secuencia de AA del interferón de la presente invención es al menos 70 % homóloga a las secuencias de interferón enumeradas en la Tabla 1 como se determina mediante el uso del programa informático BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de parámetros predeterminados). En una modalidad, la secuencia de AA del interferón de la presente invención es al menos 80 % homóloga a las secuencias de interferón enumeradas en la Tabla 1 como se determina mediante el uso del programa informático BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de parámetros predeterminados). En una modalidad, la

secuencia de AA del interferón de la presente invención es al menos 90 % homóloga a las secuencias de interferón enumeradas en la Tabla 1 como se determina mediante el uso del programa informático BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de parámetros predeterminados). En una modalidad, la secuencia de AA del interferón de la presente invención es al menos 95 % homóloga a las secuencias de interferón enumeradas en la Tabla 1 como se determina mediante el uso del programa informático BlastP del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante el uso de parámetros predeterminados). En algunas modalidades, la homología de acuerdo con la presente invención abarca además deleciones, inserciones, o variantes de sustitución, que incluyen una sustitución de AA, de estas y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de estas. En una modalidad la cisteína en la posición 17 del interferón β se sustituye por una Serina (sec. con núm. de ident.: 24).

La Tabla 1 a continuación enumera los ejemplos de interferones con sus respectivos números de secuencia de NCBI

Tabla 1

Nombre del interferón	Número de secuencia de NCBI
interferón, β 1	NP_002167.1

En otra modalidad, la presente invención proporciona un péptido de interferón beta 1 que tiene además un péptido de AA de CTP en el N-terminal y un péptido de AA de CTP en el C-terminal para el uso en el tratamiento o la inhibición de la esclerosis múltiple. En otra modalidad, la presente invención proporciona un péptido de interferón beta 1 expuesto en la sec. con núm. de ident.: 24 que tiene además un péptido de AA de CTP en el N-terminal y un péptido de AA de CTP en el C-terminal para el tratamiento o la inhibición de la esclerosis múltiple. En otra modalidad, la presente invención proporciona un péptido de interferón beta 1 expuesto en la sec. con núm. de ident.: 24 que tiene además en el N-terminal el péptido señal de la sec. con núm. de ident.: 26 y un péptido de AA de CTP en el N-terminal de la sec. con núm. de ident.: 26 y un péptido de AA de CTP en el C-terminal de la sec. con núm. de ident.: 24 para el uso en el tratamiento o la inhibición de la esclerosis múltiple.

En una modalidad, el homólogo se refiere, además, a una deleción, inserción, o variante de sustitución, que incluye una sustitución de AA, de esta y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de esta.

En otra modalidad, la presente invención proporciona el interferón beta-1b que tiene además un péptido de AA de CTP en el N-terminal y un péptido de AA de CTP en el C-terminal para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

En una modalidad, la invención se emplea en la medicina veterinaria. En una modalidad, la presente invención proporciona el tratamiento de mamíferos domésticos que se mantienen como animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, caballos), que tienen valor comercial significativo (por ejemplo, vacas lecheras, ganado vacuno, animales de deporte), que tienen valor científico significativo (por ejemplo, ejemplares en cautiverio o libres o especies en peligro de extinción), o que tienen valor de cualquier otra manera.

En una modalidad, los polipéptidos, anticuerpos, o polinucleótidos de la presente invención se administran a un animal (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, conejillo de indias, cerdos, microcerdo, pollo, camello, cabra, caballo, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano, y ser humano. En una modalidad, las aplicaciones mencionadas tienen usos en una amplia variedad de huéspedes. En algunas modalidades, tales huéspedes incluyen, pero no se limitan a, ser humano, murino, conejo, cabra, conejillo de indias, camello, caballo, ratón, rata, hámster, cerdo, micro-cerdo, pollo, cabra, vaca, oveja, perro, gato, o primate no humano.

En una modalidad, los animales de granja se tratan mediante los métodos de la presente invención. En una modalidad, los animales de granja incluyen cerdos, ganado, vacas lecheras, caballos, cabras, oveja, pollos, pavos reales, gansos, patos y especies relacionadas. En una modalidad, los animales de laboratorio se tratan mediante los métodos de la presente invención. En una modalidad, los animales de laboratorio incluyen ratas, ratones, conejillos de indias, conejos, cabras, monos, perros, gatos y otros. En una modalidad, los animales de zoológico se tratan mediante los métodos de la presente invención. En una modalidad, los animales de zoológico incluyen todos los animales vertebrados mantenidos en zoológicos. En una modalidad, los animales acuáticos se tratan mediante los métodos de la presente invención. En una modalidad, los animales acuáticos incluyen pez, anguilas, tortugas, focas, pingüinos, tiburones, ballenas, y especies relacionadas. En una modalidad, los animales domésticos se tratan mediante los métodos de la presente invención. En una modalidad, los animales domésticos incluyen cualquier mascota, tales como gatos y perros, o animal que es mantenida por humanos, por ejemplo, caballos, ganado, cerdos, cabras, conejos, pollos, pavos reales, gansos, patos y similares.

De acuerdo con la presente invención el término cerdos incluye cerdos, lechones, puercos, cerdas jóvenes, cerdos castrados, verracos y cerdas. En otra modalidad, "ganado" se refiere a terneros, vacas, vacas lecheras, novillos, bueyes y toros.

En algunas modalidades, la modificación de las secuencias de CTP es ventajosa al permitir que se usen dosificaciones más bajas.

5 En algunas modalidades, "polipéptido" como se usa en la presente descripción abarca polipéptidos nativos (ya sean productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), así como también peptoides y semipeptoides que son análogos polipeptídicos, que tienen, en algunas modalidades, modificaciones que hacen que los polipéptidos sean incluso más estables en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células.

10 En determinadas modalidades, las modificaciones incluyen, pero no se limitan a modificación del N terminal, modificación del C terminal, modificación de los enlaces polipeptídicos, que incluyen, pero no se limitan a, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la cadena principal, y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos se conocen bien en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). A continuación se proporcionan más detalles al respecto.

15 En algunas modalidades, se sustituyen los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido. En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces cetometileno (-CO-CH₂-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces tioamida (-CS-NH-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por doble enlaces olefínicos (-CH=CH-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces retro amida (-NH-CO-). En algunas modalidades, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por derivados de polipéptidos (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", presentada naturalmente en el átomo de carbono. En algunas modalidades, 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.

20 En algunas modalidades, los AA aromáticos naturales del polipéptido tales como Trp, Tyr y Phe, pueden sustituirse por ácidos sintéticos no naturales tales como Fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados de Phe metilados en el anillo, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr. En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más AA modificados o uno o más monómeros de moléculas diferentes a AA (por ejemplo ácido graso, carbohidratos complejos etcétera).

25 En una modalidad, se entiende que "AA" o "AA" incluye los 20 AA de origen natural; aquellos AA modificados frecuentemente después de la traducción *in vivo*, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otro AA inusual que incluye, pero no se limita a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. En una modalidad, "AA" incluye AA tanto D como L.

30 En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en productos terapéuticos que requieren que los polipéptidos se encuentren en una forma soluble. En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más AA polares no naturales o naturales, que incluyen pero no se limitan a serina y treonina que son capaces de aumentar la solubilidad de los polipéptidos debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

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

40 En algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención se sintetizan bioquímicamente tal como mediante el uso de técnicas estándar en fase sólida. En algunas modalidades, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos, o síntesis clásica en solución. En algunas modalidades, estos métodos se usan cuando el polipéptido es relativamente corto (aproximadamente 5-15 kDa) y/o cuando este no puede producirse mediante técnicas recombinantes (es decir, no codificado por una secuencia de ácidos nucleicos) y por lo tanto implica una química diferente.

45 En algunas modalidades, los procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida se conocen bien por un experto en la técnica y se describen más aún por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2da Ed., Pierce Chemical Company, 1984). En algunas modalidades, los polipéptidos sintéticos se purifican mediante cromatografía líquida preparativa de alta resolución [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman y Co. N.Y.] y la composición de estos puede confirmarse mediante la secuenciación de AA mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

En algunas modalidades, se usan las técnicas de proteína recombinante para generar los polipéptidos de la presente invención. En algunas modalidades, se usan las técnicas de proteína recombinante para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, más largos que 18-25 AA). En algunas modalidades, se usan las técnicas de proteína recombinante para la generación de grandes cantidades del polipéptido de la presente invención. En algunas modalidades, las técnicas recombinantes se describen 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, páginas 421-463.

En una modalidad, un polipéptido de la presente invención se sintetiza mediante el uso un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se liga en un vector de expresión, que comprende un control transcripcional de una secuencia reguladora cis (por ejemplo, secuencia promotora). En algunas modalidades, la secuencia reguladora cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva del polipéptido de la presente invención. En algunas modalidades, la secuencia reguladora cis es adecuada para dirigir la expresión específica de tejidos del polipéptido de la presente invención. En algunas modalidades, la secuencia reguladora cis es adecuada para dirigir la expresión inducible del polipéptido de la presente invención.

En algunas modalidades, los polinucleótidos que expresan los polipéptidos de la presente invención son como se expone en las secuencias con núm. de ident.: 20, 21, 44, 45 y 46.

En alguna modalidad, los promotores específicos de tejido adecuados para el uso con la presente invención incluyen secuencias que son funcionales en una población específica de células, por ejemplo incluidos, pero no se limitan a promotores tales como la albúmina que es específica de hígado [Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], promotores linfoides específicos [Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275]; en particular promotores de receptores de células T [Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) *Cell* 33729-740], promotores específicos de neuronas tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 86:5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlunch et al. (1985) *Science* 230:912-916] o promotores específicos de glándulas mamarias tal como el promotor del suero de la leche (patente de los Estados Unidos núm. 4.873.316 y Publicación de la Solicitud Europea núm. 264.166). Los promotores inducibles adecuados para el uso con la presente invención incluyen por ejemplo el promotor inducible por tetraciclina (Srouf, M.A., et al., 2003. *Thromb. Haemost* 90: 398-405).

En una modalidad, la frase "un polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos mono o bicatenaria que se aísla y se proporciona en la forma de una secuencia de ARN, una secuencia polinucleotídica complementaria (ADNc), una secuencia polinucleotídica genómica y/o unas secuencias polinucleotídicas compuestas (por ejemplo, una combinación de los anteriores).

En una modalidad, "secuencia polinucleotídica complementaria" se refiere a una secuencia que resulta de la transcripción inversa del ARN mensajero mediante el uso de una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. En una modalidad, la secuencia puede amplificarse posteriormente *in vivo* o *in vitro* mediante el uso de una ADN polimerasa.

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

En una modalidad, "secuencia polinucleotídica compuesta" se refiere a una secuencia, que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una modalidad, una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exonales necesarias para codificar el polipéptido de la presente invención, así como también algunas secuencias intrónicas que se interponen entre sí. En una modalidad, las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier fuente, que incluyen otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal conservadas de corte y empalme. En una modalidad, las secuencias intrónicas incluyen los elementos reguladores de expresión que actúan en cis.

En una modalidad, los polinucleótidos de la presente invención comprenden además una secuencia señal que codifica un péptido señal para la secreción de los polipéptidos de la presente invención.

En algunas modalidades, las secuencias señal incluyen, pero no se limitan a la secuencia señal endógena para EPO como se expone en la sec. con núm. de ident.: 19 o la secuencia señal endógena para IFN- γ 1 como se expone en la sec. con núm. de ident.: 26. En otra modalidad, la secuencia señal es 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) opcionalmente 1 o más secuencias de CTP adicionales. En otra modalidad, 1 o más secuencias de CTP se insertan entre la secuencia señal de una secuencia polipeptídica de interés y la secuencia polipeptídica de interés en sí, que interrumpe por lo tanto la secuencia silvestre de interés.

En una modalidad, después de la expresión y la secreción, los péptidos señal se escinden de las proteínas precursoras lo que da como resultado las proteínas maduras.

5 En algunas modalidades, los polinucleótidos de la presente invención se preparan mediante el uso de técnicas de PCR como las descritas en el Ejemplo 1, o cualquier otro método o procedimiento conocido por un experto en la técnica. En algunas modalidades, el procedimiento implica la ligación de dos secuencias de ADN diferentes (Ver, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

10 En una modalidad, los polinucleótidos de la presente invención se insertan en los vectores de expresión (es decir, un constructo de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en procariontes. En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación y la integración en eucariotas.

15 En una modalidad, el vector de expresión de la presente invención incluye un vector lanzadera que hace que este vector sea adecuado para la replicación y la integración tanto en procariontes como en eucariotas. En algunas modalidades, los vectores de clonación comprenden secuencias de iniciación de transcripción y traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

20 En una modalidad, puede usarse una variedad de células procariontes o eucariotas como sistemas de expresión en huésped para expresar los polipéptidos de la presente invención. En algunas modalidades, estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN recombinante de bacteriófagos, vector de expresión de ADN plasmídico o ADN cósmido que contiene la secuencia codificante de polipéptidos;

25 levadura transformada con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen la secuencia codificante de polipéptidos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes, tal como el plásmido Ti, que contiene la secuencia codificante de polipéptidos.

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

35

En algunas modalidades, en los sistemas bacterianos de la presente invención, puede seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión en dependencia del uso pretendido para el polipéptido expresado. En una modalidad, se desean grandes cantidades de polipéptido. En una modalidad, se desean vectores

40 que dirijan la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, lo que dirige el producto expresado al periplasma de las bacterias o al medio de cultivo donde el producto proteico se purifique fácilmente. En una modalidad, determinada proteína de fusión se modifica por ingeniería genética con un sitio de escisión específico para ayudar a la recuperación del polipéptido. En una modalidad, los vectores adaptables a tal manipulación incluyen, pero no se limitan a, las series pET de vectores de

45 expresión en *E. coli* [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].

En una modalidad, se usan sistemas de expresión en levadura. En una modalidad, pueden usarse una serie de vectores que contengan promotores constitutivos o inducibles en levadura como se describe en la solicitud de

50 patente de los Estados Unidos núm.: 5.932.447. En otra modalidad, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN foráneo en el cromosoma de levaduras.

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

55 quimérico promotor.

En algunas modalidades, los vectores de expresión en mamíferos incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que se encuentran disponibles de Invitrogen, pCI que se encuentra disponible de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que se encuentran disponibles de Stratagene, pTRES que se encuentra disponible de Clontech, y sus derivados.

60

En algunas modalidades, se usan en la presente invención vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como los retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas modalidades, los vectores derivados del virus de papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Barr incluyen pHEBO, y p2O5. Otros vectores ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permite la expresión de proteínas bajo la dirección

65

del promotor temprano de SV-40, el promotor tardío de SV-40, el promotor de metalotioneina, el promotor del virus de tumores mamarios murinos, el promotor del virus de sarcoma de Rous, el promotor de polihedrina, u otros promotores demuestran ser eficaces para la expresión en células eucariotas.

5 En algunas modalidades, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de los polipéptidos de la presente invención ya que ofrecen ventajas tales como la infección lateral y la especificidad de direccionamiento. En una modalidad, la infección lateral es inherente en el ciclo de vida de, por ejemplo, los retrovirus y es el proceso mediante el que una única célula infectada produce muchos viriones progenie que brotan e infectan las células vecinas. En una modalidad, el resultado es que se infecta rápidamente un área grande, la mayoría de la cual no se infectó inicialmente por las partículas virales originales. En una modalidad, los vectores virales se producen de manera que son incapaces de dispersarse lateralmente. En una modalidad, esta característica puede ser útil si el propósito deseado es introducir un gen específico solo en un número localizado de células objetivo.

10 En una modalidad, pueden usarse varios métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención en las células. Tales 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 estable o transiente, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, ver las patentes de los Estados Unidos núms. 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positiva y negativa.

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

20 En una modalidad, se apreciará que los polipéptidos de la presente invención pueden expresarse, además, a partir de un constructo de ácido nucleico administrado al individuo mediante el empleo de cualquier modo adecuado de administración, descrito anteriormente (es decir, terapia génica *in vivo*). En una modalidad, el constructo de ácido nucleico se introduce en una célula adecuada mediante un vehículo/método apropiado de suministro de genes (transfección, transducción, recombinación homóloga, etcétera) y un sistema de expresión según sea necesario y después las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica *ex vivo*).

25 En una modalidad, se ha intentado la terapia génica *in vivo* mediante el uso de 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 probado éxito en ensayos clínicos en humanos para pacientes con fallo renal crónico [Lippin et al *Blood* 2005, 106, Número 7].

30 En una modalidad, se usan vectores de expresión en plantas. En una modalidad, la expresión de una secuencia codificante de polipéptidos se conduce por una serie de promotores. En algunas modalidades, se usan promotores virales tales como los promotores del ARN 35S y ARN 19S de CaMV [Brisson et al., *Nature* 310:511-514 (1984)], o el promotor de la proteína de revestimiento para TMV [Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311 (1987)]. En otra modalidad, se usan promotores vegetales tales como, por ejemplo, la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); y Brogli et al., *Science* 224:838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de frijol de soya [Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 (1986)]. En una modalidad, los constructos se introducen en células vegetales mediante el uso de plásmido Ti, plásmido Ri, vectores de virales de plantas, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por el experto. Ver, por ejemplo, Weissbach & Weissbach [*Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, páginas 421-463 (1988)]. Otros sistemas de expresión tales como insectos y sistemas de células huésped de mamífero, que se conocen bien en la técnica, pueden usarse también mediante la presente invención.

35 Se apreciará que aparte de que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), el constructo de expresión de la presente invención puede incluir también secuencias modificadas mediante ingeniería genética para optimizar la estabilidad, la producción, la purificación, el rendimiento o la actividad del polipéptido expresado.

40 Pueden usarse varios métodos, en algunas modalidades, para introducir el vector de expresión de la presente invención en el sistema de células huésped. En algunas modalidades, tales 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 estable o transiente,

lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, ver las patentes de los Estados Unidos núms. 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positiva y negativa.

5 En algunas modalidades, las células transformadas se cultivan bajo condiciones eficaces, que permitan la expresión de grandes cantidades de polipéptido recombinante. En algunas modalidades, las condiciones eficaces de cultivo incluyen, pero no se limitan a, condiciones eficaces de medios, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permitan la producción de proteínas. En una modalidad, 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 modalidades, un medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales apropiadas, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas. En algunas modalidades, las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores convencionales de fermentación, matraces de agitación, tubos de ensayos, platos de microtitulación y placas petri. En algunas modalidades, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiado para una célula recombinante. En algunas modalidades, las condiciones de cultivo se encuentran dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

10 En algunas modalidades, en dependencia del vector y el sistema huésped usado para la producción, los polipéptidos resultantes de la presente invención permanecen dentro de la célula recombinante, secretados en un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplásmico en *E. coli*; o se retienen en la superficie externa de una membrana celular o viral.

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

20 En una modalidad, la frase "recuperación del polipéptido recombinante" usada en la presente descripción se refiere a recolectar todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no necesita implicar etapas adicionales de separación o purificación.

25 En una modalidad, los polipéptidos de la presente invención se purifican mediante el uso de una variedad de técnicas estándar de purificación de proteínas, tales como, pero no se limitan a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía por interacciones hidrófobas, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de Concanavalina A, cromatografía de solubilización diferencial.

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

35 En una modalidad, el polipéptido de la presente invención se obtiene en forma "sustancialmente pura".

40 En una modalidad, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permita el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en la presente descripción.

45 En una modalidad, el polipéptido de la presente invención puede sintetizarse también mediante el uso de sistemas de expresión *in vitro*. En una modalidad, los métodos de síntesis *in vitro* se conocen bien en la técnica y los componentes del sistema se encuentran comercialmente disponibles.

50 La producción de los polipéptidos CTP-EPO-CTP mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante se ilustra en el Ejemplo 1.

55 En algunas modalidades, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y se purifican; su eficacia terapéutica puede analizarse ya sea *in vivo* o *in vitro*. Las actividades de unión de los polipéptidos EPO recombinantes pueden determinarse mediante el uso de varios ensayos como se describe en los Ejemplos 2-6 y 8-9. Se describe que la actividad de unión *in vitro* puede determinarse mediante la medición de la capacidad del polipéptido de estimular la proliferación de células TF-1, o puede deducirse la actividad *in vivo* mediante el análisis de los niveles de hematocrito (Figuras 3-5) y/o como un porcentaje de reticulocitos.

60 Los métodos de la tecnología de ADN recombinante pueden usarse para la producción de polipéptidos CTP-hGH-CTP como se ilustra en el Ejemplo 7.

65 En algunas modalidades, los polipéptidos de interferón de la presente invención se usan para tratar a un sujeto, con una variedad de afecciones tales como leucemia de células pilosas (HCL), sarcoma de Kaposi (KS), leucemia mieloide crónica (CML), hepatitis C crónica (CHC), condiloma acuminata (CA), hepatitis B crónica, melanoma

maligno, linfoma no Hodgkin folicular, esclerosis múltiple, enfermedad granulomatosa crónica, complejo *Mycobacterium avium* (MAC), fibrosis pulmonar y osteoporosis.

En una modalidad, los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo *per se*. En una modalidad, los polipéptidos de la presente invención pueden proporcionarse al individuo como parte de una composición farmacéutica donde esta se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente descripción con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En una modalidad, "ingrediente activo" se refiere a la secuencia polipeptídica de interés, que es responsable del efecto biológico.

Las composiciones de esta invención comprenden dos secuencias de CTP unidas a la proteína interferón beta 1 como se describió anteriormente. En una modalidad, la presente invención proporciona preparaciones combinadas. En una modalidad, "una preparación combinada" define especialmente un "estuche de partes" en el sentido que las partes de la combinación como se definió anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijadas con cantidades determinadas de las partes de la combinación es decir, simultáneamente, concurrentemente, por separado o secuencialmente. En algunas modalidades, las partes del estuche de partes pueden administrarse después, por ejemplo, simultáneamente o cronológicamente escalonadas, o sea, en puntos de tiempo diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del estuche de partes. La relación de la cantidad total de las partes de la combinación, en algunas modalidades, puede administrarse en la preparación combinada. En una modalidad, la preparación combinada se puede variar, por ejemplo, con el objetivo de hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes a tratar o a las necesidades de un único paciente cuyas diferentes necesidades pueden deberse a una enfermedad particular, severidad de una enfermedad, edad, sexo, o peso corporal como puede hacer fácilmente una persona experta en la materia.

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

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

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co, Easton, PA, última edición.

En una modalidad, las rutas adecuadas de administración incluyen, por ejemplo, suministro oral, rectal, transmucosal, transnasal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como también inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

En una modalidad, la preparación es para que se administre de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

Varias modalidades de intervalos de dosificación se contemplan en esta invención. La dosificación del polipéptido de la presente invención, en una modalidad, se encuentra en el intervalo de 0,05-80 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 0,05-50 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 0,1-20 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 0,1-10 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 0,1-5 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 0,5-5 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 0,5-50 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 5-80 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 35-65 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 35-65 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 20-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en un intervalo de 45-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en un intervalo de 60-120 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 120-240 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 40-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en un intervalo de 240-400 mg/día. En

otra modalidad, la dosificación se encuentra en un intervalo de 45-60 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 15-25 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 5-10 mg/día. En otra modalidad, la dosificación se encuentra en el intervalo de 55-65 mg/día.

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

10 La administración oral, en una modalidad, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende tabletas, cápsulas, pastillas, tabletas masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Tales formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y eficaz del compuesto deseado, o los compuestos, cada uno de los cuales se encuentra en una modalidad, de aproximadamente 0,7 o 3,5 mg a aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra modalidad, aproximadamente 0,5 o 10 mg a aproximadamente 210 mg/70 kg. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de las formas de dosificación unitaria para administración peroral se conocen bien en la técnica. En algunas modalidades, las tabletas comprenden típicamente adyuvantes convencionales farmacéuticamente compatibles como diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes tales como almidón, gelatina y sacarosa; desintegrantes tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una modalidad, pueden usarse agentes de deslizamiento tal como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla en polvo. En una modalidad, los agentes colorantes, tales como los colorantes FD&C, pueden añadirse para la apariencia. Los edulcorantes y agentes saborizantes, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta, y sabores frutales, son adyuvantes útiles para tabletas masticables. Las cápsulas comprenden típicamente uno o más diluyentes sólidos descritos anteriormente. En algunas modalidades, la selección de componentes portadores depende de consideraciones secundarias como sabor, costo, y estabilidad en anaquel, que no son críticas para los propósitos de esta invención, y puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.

En una modalidad, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una modalidad, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende unas tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación prolongada. En una modalidad, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende unas tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación lenta. En una modalidad, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende unas tabletas, cápsulas, pastillas o tabletas masticables de liberación inmediata. En una modalidad, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el perfil de liberación deseado del ingrediente activo farmacéutico como es conocido por un experto en la técnica.

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

En algunas modalidades, las composiciones para el uso en esta invención comprenden soluciones o emulsiones, que en algunas modalidades son soluciones o emulsiones que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos de la presente invención y opcionalmente, otros compuestos, destinados para administración intranasal tópica. En algunas modalidades, las composiciones comprenden de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 10,0 % p/v de un compuesto sujeto, con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2,0, que se usa para el suministro sistémico de los compuestos mediante la ruta intranasal.

50 En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas son para que se administren mediante inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. En algunas modalidades, las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas son para que se administren por vía intravenosa, y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas son para que se administren por vía intraarterial, y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas son para que se administren por vía intramuscular, y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

60 Además, en otra modalidad, las composiciones farmacéuticas son para que se administren en forma tópica a las superficies corporales, y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, los compuestos de la presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos apropiados adicionales, se preparan y aplican como soluciones, suspensiones, o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un portador farmacéutico.

65 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican, por ejemplo mediante

procesos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

5 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas para el uso de acuerdo con la presente invención se formulan de una manera convencional mediante el uso de uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. En una modalidad, la formulación es dependiente de la ruta de administración escogida.

10 En una modalidad, los inyectables de la invención se formulan en soluciones acuosas. En una modalidad, los inyectables de la invención se formulan en amortiguadores fisiológicamente compatibles tal como la solución de Hank, solución de Ringer, o amortiguador salino fisiológico. En algunas modalidades, para la administración transmucosal, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes generalmente se conocen en la técnica.

15 En una modalidad, las preparaciones descritas en la presente descripción se formulan para administración parenteral, por ejemplo, mediante la inyección en bolo o infusión continua. En algunas modalidades, las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis opcionalmente, con un conservante añadido. En algunas modalidades, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

20 Las composiciones comprenden además, en algunas modalidades, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal y similares; agentes quelantes, tales como edetato sódico y otros; amortiguadores tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad tales como cloruro sódico, cloruro de potasio, glicerina, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfito sódico y otros; agentes aromáticos; reguladores de viscosidad, tales como polímeros, que incluyen celulosa y derivados de estos; y alcohol polivinílico y ácidos y bases para regular el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones comprenden además, en algunas modalidades, anestésicos locales u otros activos. Las composiciones pueden usarse como aerosoles, nebulizaciones, gotas, y similares.

25 En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los ingredientes activos, en algunas modalidades, se preparan como suspensiones para inyección basadas en aceite o agua. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen, en algunas modalidades, aceites grasos tal como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección contienen, en algunas modalidades, sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. En otra modalidad, la suspensión contiene además estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

30 En otra modalidad, el compuesto activo puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver 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, páginas 353-365 (1989); Lopez-Berestein, mismo trabajo, páginas 317-327; ver generalmente el mismo trabajo).

35 En otra modalidad, la composición farmacéutica suministrada en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una modalidad, se usa una bomba (ver Langer, supra; 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 modalidad, pueden usarse materiales poliméricos. Aún en otra modalidad, un sistema de liberación controlada puede colocarse próximo al blanco terapéutico, es decir, el cerebro, que requiere por lo tanto solo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, páginas 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se exponen en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990).

40 En algunas modalidades, el ingrediente activo se encuentra en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución estéril, basada en agua libre de pirógenos, antes de su uso. Las composiciones se formulan, en algunas modalidades, para la administración por atomización e inhalación. En otra modalidad, las composiciones se encuentran en un recipiente con medios de atomización unidos.

45 En una modalidad, la preparación de la presente invención se formula en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, mediante el uso, por ejemplo, de bases convencionales de supositorios tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

50 En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos se encuentran en una cantidad eficaz para

lograr el propósito pretendido. En algunas modalidades, una cantidad con eficacia terapéutica significa una cantidad de ingredientes activos eficaz para evitar, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la sobrevivencia del sujeto que se trata.

- 5 En una modalidad, la determinación de una cantidad con eficacia terapéutica se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables o componentes de estos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tal como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, y metilcelulosa; 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 girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; ácido alginico; emulsionantes, tales como emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, como laurilsulfato sódico; agentes colorantes; agentes saborizantes; agentes de formación de tabletas, estabilizantes; antioxidantes; conservantes; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; y soluciones de amortiguador fosfato. La elección de un portador farmacéuticamente aceptable para su uso junto con el compuesto se determina básicamente por la forma que se administrará el compuesto. Si el compuesto sujeto es para inyección, en una modalidad, el portador farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica, estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, el pH del cual se ha regulado a aproximadamente 7,4.

Además, las composiciones pueden comprender además aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de guar, glicolato de almidón sódico), amortiguadores (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de varios pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasa, tensoactivos (por ejemplo, laurilsulfato sódico), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etil celulosa, goma de guar), edulcorantes (por ejemplo aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato sódico), adyuvantes de flujo (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato sódico), revestimientos de polímero (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de revestimiento y formadores de película (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

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

Las composiciones incluyen, además, la incorporación del material activo dentro o en las preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etcétera, o en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, eritrocitos fantasmas, o esferoplastos.) Tales composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo*, y la tasa de aclaramiento *in vivo*.

También están comprendidas por la invención las composiciones en partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra los receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplado a ligandos de los receptores específicos de tejido.

En algunas modalidades, los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. En otra modalidad, los compuestos modificados muestran una vida media sustancialmente más larga en sangre después de la inyección intravenosa que la de los compuestos no modificados correspondientes. En una modalidad, las modificaciones aumentan, además, la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminan la agregación, mejoran la estabilidad física y química del compuesto, y reducen grandemente la inmunogenicidad y la reactividad del compuesto. En otra modalidad, la actividad biológica deseada *in vivo* se alcanza mediante la administración de tales aductos polímero-compuesto con menos frecuencia o en dosis menores que con el compuesto sin modificar.

En algunas modalidades, la preparación de la cantidad o dosis eficaz puede estimarse inicialmente a partir de los ensayos *in vitro*. En una modalidad, una dosis puede formularse en modelos animales y tal información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

5 En una modalidad, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente descripción pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una modalidad, los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para el uso en humanos. En una modalidad, las dosificaciones varían en dependencia de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. En una modalidad, la formulación exacta, el médico individual puede escoger la ruta de administración y la dosificación según la afección del paciente. (Ver, por ejemplo, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1].

15 En una modalidad, en dependencia de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, con un tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se consigue la cura o se logra la disminución del estado de la enfermedad.

20 En una modalidad, la cantidad de una composición a administrar será, por supuesto, dependiente del sujeto que se trata, la gravedad de la dolencia, la forma de administración, y la valoración del médico que prescribe, etcétera.

En una modalidad, las composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un portador farmacéutico compatible se preparan, además, colocadas en un recipiente adecuado, y se etiquetan para el tratamiento de una afección indicada.

25 En una modalidad, las composiciones de la presente invención se presentan en un envase o dispositivo dispensador, tal como un estuche aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. En una modalidad, el envase comprende, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase tipo burbuja. En una modalidad, el envase o dispositivo dispensador se acompaña por instrucciones para la administración. En una modalidad, el envase o dispensador se acompaña de un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de los productos farmacéuticos, cuyo aviso es reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Tal aviso, en una modalidad, se etiqueta aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos para fármacos controlados o el prospecto del producto aprobado.

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

40 Los objetivos, ventajas, y características novedosas adicionales de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la técnica tras la revisión de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Además, cada una de las diversas modalidades y aspectos de la presente invención como se definió anteriormente y se reivindica en la sección de reivindicaciones más abajo encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

50 En general, la nomenclatura usada en la presente descripción y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Ver, 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", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de los Estados Unidos. núms. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659y 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" (8va Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.984.533; 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" Volúmenes 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). Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento.

En la medida en que los siguientes Ejemplos no se refieran a polipéptidos que comprenden un péptido de interferón-beta 1, en donde un primer CTP de la gonadotropina coriónica se une al amino terminal del péptido de IFNβ1, y el segundo CTP de la gonadotropina coriónica se une al carboxi terminal del péptido de IFNβ1, a secuencias de ácido nucleico que los codifican, y a los usos de estos, son Ejemplos comparativos.

Ejemplo 1

Generación de constructos de EPO

Materiales y métodos:

Construcción del vector de expresión pCI-dhfr: el vector de expresión en mamífero pCI-neo se compró de Promega (núm. de catálogo E1841). El vector contiene un potenciador/promotor IE de CMV y un gen de neomicina fosfotransferasa. El clon pSV2-dhfr se compró de ATCC (núm. de catálogo 37146). El plásmido contiene el gen dhfr murino. La construcción del vector pCI-dhfr se realizó como sigue:

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

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

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

Construcción de las variantes hEPO-CTP: Un casete génico que contiene el péptido C-Terminal (CTP) de la subunidad beta de hCG se fusionó con la secuencia codificante de EPO humana (NP_000790.2) en diferentes posiciones. Se construyeron cuatro variantes EPO-CTP como se ilustra en las Figuras 1A-D. El péptido señal proEPO se usó para la construcción de las variantes EPO-CTP secretadas. Los fragmentos XbaI - NotI que contienen secuencias Epo se ligaron en el vector de expresión pCI-dhfr de la presente invención.

La Tabla 2 a continuación resume las secuencias de cebadores usadas para construir los polipéptidos que contienen CTP de la presente invención.

Tabla 2

Número de cebador	Sec. con núm. de ident.	secuencia	Sitio de restricción (subrayado en la secuencia)
1	7	5' <u>AATCTAGAGG</u> TCATCATGGGGGTGC 3'	XbaI
2	8	5'ATT <u>GCGGCCG</u> CGGATCCAGAAGACCTTTATTG 3'	NotI
17 ^R	9	5' TAAATATTGGGGGTGTCCGAGGGCCC 3'	SspI
10	10	5' <u>CCAATATT</u> ACCACAAGCCCCACCACGCCTCAT 3'	SspI
11 ^R	11	5' <u>TGCGGCCG</u> CGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC 3'	NotI
15	12	5' GCCCTGCTGTCCGAAGC 3'	
2 ^R	13	5' ATT <u>GCGGCCG</u> CGGATCCAGAAGACCTTTATTG	NotI
23 ^R	14	5'CTTTGAGGAAGAGGAGCCCAGGACTGGGAGGC3'	
24	15	5' CCTGGGCTCCTCTCCTCAAAGGC 3'	
38 ^R	16	5' GCTCCGACAGCAGGGC 3'	

EPO-1 701-1-p17-6 (Epo-1 - sec. con núm. de ident.: 1): El fragmento XbaI-NotI de 702 pb se construyó mediante PCR mediante el uso los cebadores anteriores (sec. con núms. de ident.: 7-16). Después el fragmento de PCR XbaI-NotI que contiene la secuencia Epo-ctp se ligó en el vector de expresión pCI-dhfr.

EPO-2 701-2-p24-2 (Epo-2- sec. con núm. de ident.: 2): El fragmento XbaI/ApaI (hGH-ctp) de pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH-ctpx2) se reemplazó con el fragmento XbaI/ApaI (EPO-ctp) de 701-1-p17-6 para crear un Epo-ctpx2.

EPO-4-701-4-p42-1(Epo-4 - sec. con núm. de ident.: 4): En primer lugar, se construyó un fragmento de pCI-dhfr-EPO-ctp (701-1-p17-6) mediante PCR mediante el uso de los cebadores 1 y 17 seguido por la digestión con XbaI/SspI. Esto dio como resultado un fragmento que contiene EPO y CTP 5' parcial.

En segundo lugar, se construyó un nuevo fragmento mediante PCR de cebadores superpuestos, en pGT123-hEpo como una plantilla, mediante el uso del cebador 10 y el cebador 11. La digestión con SspI/NotI dio como resultado un fragmento que contiene CTP 3' parcial y Epo.

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

EPO-3-p56-6 (Epo-3 sec. con núm. de ident.; 3): Los cebadores se compraron de Sigma-Genosys. La reacción de PCR se realizó mediante el uso del cebador 15 (sec. con núm. de ident.: 12) y el cebador 2^R (sec. con núm. de ident.: 13) y el ADN plasmídico de pCI-dhfr- EPO-ctp x2 (701-2-p24-2) como una plantilla. Como un 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 el fragmento Stu I -NotI que contiene la secuencia *Epo-ctp x2 (209 pb).

Se realizaron tres reacciones de PCR secuenciales. La primera reacción se llevó a cabo con el cebador 1 (sec. con núm. de ident.: 7) y el cebador 23^R(sec. con núm. de ident.: 14) y el ADN plasmídico de pGT123-epo-ctp como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 80 pb (péptido señal).

La segunda reacción se llevó a cabo con el cebador 24 (sec. con núm. de ident.: 15) y el cebador 11^R (sec. con núm. de ident.: 11) y el ADN plasmídico de 701-4-p42-1 como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 610 pb.

La última reacción se llevó a cabo con los cebadores 1 (sec. con núm. de ident.: 7) y 11^R (sec. con núm. de ident.: 11) y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como una plantilla; como un 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 (triple ligación) para rendir el clon 701-3-p56-6.

EPO-5-p91-4 (Epo-5 sec. con núm. de ident.; 5- (ctp- Epo): Los cebadores se ordenaron de Sigma-Genosys. Una reacción de PCR se realizó mediante el uso del cebador 1 (sec. con núm. de ident.: 7) y el cebador 11^R (sec. con núm. de ident.: 11) y el ADN plasmídico de pCI-dhfr- ctp-EPO-ctp x2 (701-3-p56-6) como una plantilla; como un 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). El fragmento XbaI -NotI que contiene la secuencia ctp-Epo se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr para obtener el clon 701-5-p91-4.

EPO-6-p90-1 (Epo-6 sec. con núm. de ident.: 6- (ctp- Epo-ctp): Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se llevó a cabo con el cebador 1 (sec. con núm. de ident.: 7) y el cebador 38^R (sec. con núm. de ident.: 16) y el ADN plasmídico de 701-3-p56-6 como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 400 pb.

La segunda reacción se llevó a cabo con el cebador 15 (sec. con núm. de ident.: 12) y el cebador 2^R (sec. con núm. de ident.: 13) y el ADN plasmídico de 701-1-p17-6 como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 390 pb.

La última reacción se llevó a cabo con los cebadores 1 (sec. con núm. de ident.: 7) y 2^R (sec. con núm. de ident.: 13) y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 787 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI -NotI que contenía la secuencia ctp-Epo-ctp se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr para obtener el clon 701-6-p90-1.

Ejemplo 2

Expresión y Aislamiento de los polipéptidos EPO-CTP

Materiales y métodos

- 5 *Transfección de ADN y selección de clones:* las células DG44 se transfectaron con los vectores de expresión pCI-DHFR que contenían las variantes EPO-CTP mediante el uso del Reactivo FuGENE6 (Reactivo de Transfección FuGENE - Cat.11 815 091 001 de Roche). Después de 48 horas de transfección, las células se diluyeron y se sembraron a 50-200 células por pocillo en un medio selectivo (Medio CD DG44 sin HT (Gibco: parte de Escocia: #07990111A) Núm. de referencia de artículo:ME060027 complementado con L-Glutamina 8 mM de Biological Industries: Cat: 03-020-1A) y 18 mL/L de solución Pluronic F-68 al 10 % (Gibco: Cat: 240040-032). Los clones seleccionados se tamizaron para la producción más elevada de proteínas mediante el uso de ELISA comercial. Se congelaron 3-5 clones productores por cada variante para un banco celular de respaldo. Un clon seleccionado para cada variante se adaptó para el crecimiento en cultivos de mayor escala hasta matraces de 1 L en una plataforma de agitador orbital. Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron mediante ELISA, SDS-PAGE y transferencia Western. Después de la extracción de las alícuotas, los sobrenadantes que contenían proteínas se mantuvieron congelados hasta su uso.
- 15 *Cultivo celular:* las células DG44 se mantuvieron en medio DG44 con HT (cat# 12610-010, Gibco) complementado con L-Glutamina 8 mM (Biological Industries: Cat: 03-020-1A) y 18 mL/L de solución Pluronic F-68 al 10 % (Gibco: Cat: 240040-032), a 37 °C en incubadora de CO₂humedecida al 8 %. Los clones transfectados se mantuvieron en medio basal DG44 basal sin complemento de HT, hipoxantina y timidina, con ácido plurónico y L-glutamina.
- 20 *Preparación de muestras:* Los sobrenadantes se recolectaron, se filtraron y se analizaron mediante ELISA para determinar la concentración de proteínas. Se usaron SDS-PAGE y transferencia Western para determinar la pureza y la identidad. Después del ELISA, se definieron las concentraciones de las muestras y la solución se dializó contra PBS. Después de la extracción de las alícuotas, los sobrenadantes que contenían proteínas se mantuvieron congelados a -20 °C hasta su uso.
- 25 *Transferencia de membrana de Western:* Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15 % no desnaturizante. Los geles se dejaron equilibrar durante 10 min en Tris 25 mM y glicina 192 mM en metanol al 20 % (vol/vol). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,2 µm (Sigma, San Luis, MO) a 250 mA durante 3 h, mediante el uso de una celda de electroforesis Mini Trans-Blot (Biorad Laboratories, Richmond, CA). La membrana de nitrocelulosa se incubó en leche en polvo desnatada al 5 % durante 2 h a temperatura ambiente. La membrana se incubó con antisuero de EPO (título 1:1000) durante toda la noche a 4 °C seguido de tres lavados consecutivos en PBS que contiene Tween al 0,1 % (10 min/lavado). La membrana se incubó con anticuerpo secundario conjugado a 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 sustrato de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Pierce, Rockford, IL) durante 5 min, se secó con una hoja Whatman, y se expuso a una película de rayos X.

Resultados

- 40 La Tabla 3 a continuación muestra las concentraciones de varias formas de EPO modificada en CTP obtenidas a partir de 5 clones seleccionados y su preparación para análisis adicional.

Tabla 3

#Versión	# Clon	Título de reserva en UI/ml ¹	Post dilución en Mock sup. de acuerdo con el título de Epo3 en UI/ml ²	Post ultrafiltración UI/ml ³
EpoO sec. con núm. de ident.: 16	17	3093	102	335
Epo1 sec. con núm. de ident.: 1	47	1049	104	291
Epo2 sec. con núm. de ident.: 2	67	2160	110	303
Epo3 sec. con núm. de ident.: 3	85	105	119	392
Epo4 sec. con núm. de ident.: 4	112	6100	ND	342

1. La concentración de reserva de las variantes EPO se determinaron mediante ELISA (Quantikine IVD Epo ELISA, DEP00, R&D Systems)
 2. Las muestras EPO-0, 1, 2 y 4 se diluyeron a 105 UI/ml en mock sup (Ajustadas al título de Epo3). EpoO = EPO silvestre expresada en el mismo sistema que las EPO
 3 modificadas en CTP. Todas las muestras se concentraron y se dializaron mediante ultrafiltración contra PBS a una concentración final de 180 UI/ml.

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

Ejemplo 3

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

La prueba de bioactividad de TF-1 representa la capacidad de las variantes EPO-CTP de unirse a su receptor y después estimular la actividad lo que resulta en la proliferación celular. Por lo tanto, esta prueba se usó como una primera etapa en la evaluación de la potencia biológica de los polipéptidos EPO-CTP de la presente invención.

Materiales y métodos

Análisis de Proliferación Celular: El ensayo de proliferación se realizó con la línea celular TF-1, midiendo los niveles de tinción celular con MTT como una 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 en crecimiento exponencial se lavaron dos veces, se sembraron en placas a aproximadamente 10⁴ células/pocillo en placas de microtitulación, y se incubaron en medio basal con una serie de dilución titulada de EPO (Recormon), estándar de EPO (estándar de NIBSC), rhEPO (MOD-7010), variantes de MOD-701 (EPO-1, EPO-2, EPO-3 y EPO-4) durante 48 horas. 4 horas antes del ensayo de proliferación celular, se añadió el reactivo MTT a los pocillos, y se midió la absorbancia mediante un lector de ELISA. Un valor de concentración de proteínas calculado para cada variante de proteína se obtuvo a partir de la curva estándar de respuesta a dosis de Eprex (Epoetina (EPO), forma hecha por el hombre de la hormona humana).

Resultados

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

Los resultados se resumen en la Tabla 4 a continuación. Los resultados indican que se logró la potencia más elevada mediante el uso de EPO 3 y EPO 0 en ambas concentraciones de 2 y 0,5 UI/ml.

Tabla 4

STD de Eprex	Bioactividad de TF-1 UI/ml							
	UI/ml	EPO 0	EPO 1	EPO 2	EPO 3	EPO 4	Recormon	EPO st
		Sec. con núm. de ident.: 16	Sec. con núm. de ident.: 1	Sec. con núm. de ident.: 2	Sec. con núm. de ident.: 3	Sec. con núm. de ident.: 4		
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 resume en la Tabla 4 anterior, los polipéptidos EPO-CTP ejercieron diferentes niveles de potencia, lo que indica diferencias en la unión al receptor. Los polipéptidos EPO-CTP difieren en el número de casetes de CTP y en la posición en la que se fusionan. EPO-1 y EPO-2 contienen 1 secuencia de CTP o 2 secuencias de CTP en el C-terminal de EPO, mientras que EPO-3 contiene 1 CTP en N-terminal y 2 secuencias de CTP en C-terminal. EPO-4 es un dímero de dos moléculas EPO unidas por la secuencia de CTP. EPO-3 demostró un nivel de potencia muy similar a WT-EPO, mientras que EPO-1 y EPO-4 fueron aproximadamente 50 % menos potentes que WT-EPO, y la potencia de EPO-2 fue incluso menor del 50 %.

Ejemplo 4

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

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

5 Materiales y métodos

Animales:

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

Tamaño del grupo:	n=7
núm. de Grupos:	9
núm. total de Animales:	n=63

Diseño experimental del estudio: El experimento se estableció como se resume en la Tabla 5 a continuación.

15

Tabla 5

Grupo núm.	núm. de Ratones por Grupo	TRATAMIENTO		Régimen de Dosificación
		Compuesto	Nivel de dosis	
1	n=7	Vehículo (Control)	0	1x 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	
9			5 µg/kg	3 x semana

20 *Tratamiento animal:* Todos los animales se administraron con el control o con los polipéptidos EPO de prueba de la presente invención mediante inyección en bolo. El volumen de inyección no excedió de 10 ml/kg. La longitud del experimento fue 22 días. Se realizó diariamente un control de morbilidad y mortalidad.

25 *Recuento de reticulocitos y examen de hematocrito (hct):* El recuento de reticulocitos se llevó a cabo en todos los animales de prueba el día 2 y 14 horas después de la 1era inyección de vehículo o de tratamiento respectivo. El HCT se determinó en todos los animales una vez antes del tratamiento inicial (valor inicial de control "0") y 24 horas después de la 1era inyección de vehículo o tratamiento respectivo, y posteriormente dos veces por semana hasta la finalización del estudio (Día-22).

30 Resultados

35 Los resultados de hematocrito que se ilustran en las Figuras 3-5 demuestran que EPO 3 tiene el cambio de porcentaje de hematocrito más elevado con respecto al valor inicial en comparación con EPO 1, EPO 2, Recormon 1, Recormon 3, rhEPO, y el vehículo. Los resultados demuestran que el porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con los polipéptidos EPO-CTP se resumen en la Tabla 6 a continuación. Estos resultados demuestran que EPO-3 es el estimulador más potente de la eritropoyesis.

Tabla 6

	% de reticulocitos	
días	2	14

	% de reticulocitos	
días	2	14
Control	3.72	3.46
	1.08	0.8
Mock	3.5	3.64
	0.6	1.13
7010 sec. con núm. de ident.: 16	3.5	3.9
	0.6	1.54
7011 sec. con núm. de ident.: 1	3.52	1.94
	1.38	1.08
7012 sec. con núm. de ident.: 2	3.82	3.0
	1.02	0.88
7013 sec. con núm. de ident.: 3	2.66	5.20
	0.97	2.96
7014 sec. con núm. de ident.: 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

Conclusión

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

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

Ejemplo 5

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

15 El siguiente experimento se realizó para comparar la actividad biológica de una sola dosis en bolo de algunos polipéptidos EPO-CTP de la presente invención, EPO comercial y Aranesp. Aranesp es una eritropoyetina recombinante de acción prolongada en la que se introdujeron dos mutaciones de sitio, lo que resultó en dos sitios adicionales de N-glicosilación y un aumento en el número de residuos de ácido siálico incorporados.

20 Materiales y métodos

Animales:

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

Diseño experimental del estudio: El experimento se estableció como se resume en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Grupo #	Artículo de Prueba	animales/grupo/punto de tiempo	Concentración de la solución de dosis (µg/mL)	Volumen de dosis (mL/kg)	Puntos de tiempo * (horas después de la administración)
1	MOD-7010	3	1.5	10	0 (Predosis), 0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48,

Grupo #	Artículo de Prueba	animales/grupo/punto de tiempo	Concentración de la solución de dosis (µg/mL)	Volumen de dosis (mL/kg)	Puntos de tiempo * (horas después de la administración)
	Sec. con núm. de ident.: 11				96, 168, 216, 264 y 336 horas después de la administración de dosis
2	MOD-7013	3	1.5	10	0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 horas después de la administración de la dosis
	Sec. con núm. de ident.: 3				
3	Aranesp	3	1.5	10	0,25, 0,5, 1, 2, 6, 24, 48, 96, 168, 216, 264 y 336 horas después de la administración de la dosis

5 *Tratamiento animal:* Todos los animales se administraron con el control o con los polipéptidos EPO de prueba de la presente invención mediante inyección en bolo. El volumen de inyección no excedió de 10 ml/kg. La longitud del experimento fue 14 días. Se realizó diariamente un control de morbilidad y mortalidad.

Recuento de reticulocitos y examen de hematocrito (hct): El recuento de reticulocitos y el examen de hematocrito se realizaron como se describió anteriormente.

10 Resultados

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

15 Ejemplo 6

Comparación de las farmacocinéticas de los polipéptidos EPO-CTP de la presente invención con Aranesp

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

Materiales y métodos

25 Las muestras de suero se analizaron para determinar los niveles específicos de concentración para cada muestra. Los datos de concentración y punto de tiempo se procesaron mediante el uso del análisis no compartimental de WinNonLin. Los parámetros determinados incluyen: AUC, CL, Ke, t1/2, Cmáx, Tmáx, y Vdz.

30 Las concentraciones de suero se determinaron mediante el uso de dos estuches de ELISA en paralelo. La concentración en suero de EPO-3 se midió mediante el uso del estuche de ELISA StemCell en comparación con la concentración en suero de EPO-0 y Aranesp que se determinaron mediante el uso del estuche de ELISA de R&D system.

Resultados

35 Los resultados del análisis farmacocinético se resumen en la Tabla 8, a continuación. Estos resultados demuestran que EPO 3 muestra mediciones farmacocinéticas favorables como se indica, por ejemplo, en las mediciones de AUC, t1/2, y Cmáx. Las mediciones de Tmáx fueron iguales para EPO-0, EPO-3, y Aranesp.

Tabla 8

Parámetros	Unidades	EPO-0	EPO-3	Aranesp
ABCfinal	horas*mUI/mL	31739	306072	178661
CL^	ml/h/kg	1.1152	0.2188	0.1207
Ke	1/hora	0.157	0.0529	0.0639

Parámetros	Unidades	EPO-0	EPO-3	Aranesp
t1/2	h	4.4139	13.1141	10.84
Cmáx	mUI/mL	10766	16466	13266
Tmax	h	0.25	0.25	0.25
Vdz	mL/kg	7.1017	4.1394	1.8877

Los resultados de los análisis de la concentración en suero se ilustran en la Figura 9. Estos datos demuestran que EPO-3 fue detectable en el suero aún después de aproximadamente 190 horas. EPO-0 y Aranesp no fueron detectables en el suero después de aproximadamente 140 horas y 50 horas, respectivamente.

Conclusión

El aclaramiento de EPO-3 (MOD-7013) de la sangre de ratones CD-1 fue significativamente más lento que el de rhEPO o Aranesp. Los tiempos de vida media calculados correspondientes fueron: rhEPO - 4,41 h; Aranesp - 0,84 h; y MOD-7013 - 13,11 h.

Ejemplo 7

Generación de constructos de hGH

Materiales y métodos

Se sintetizaron cuatro clones de hGH (variantes de proteína de 20kD). Los fragmentos Xba I -Not I que contenían secuencias hGH de las cuatro variantes se ligaron en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr anteriormente digerido con Xba I -NotI. Se preparó el ADN de los 4 clones (401-0, 1, 2, 3 y 4). Se sintetizó, además, otro clon de hGH parcial (1-242 pb) de proteína de 22kD (0606114). Los cebadores se ordenaron de Sigma-Genosys. Las secuencias de cebadores usadas para generar los polipéptidos hGH-CTP de la presente invención se resumen en la Tabla 9, a continuación.

Tabla 9

Número de cebador	Sec. con núm. de ident.	Secuencia	Sitio de restricción (subrayado en la secuencia)
25	27	5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3'	XbaI
32 ^R	28	5' ACAGGGAGGTCTGGGGTTCTGCA 3'	
33	29	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 ^R	30	5' CCAAACCTCATCAATGTATCTTA 3'	
25	31	5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3'	XbaI
35 ^R	32	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	33	5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTCG 3'	
37 ^R	34	5' <u>ACGCGGCCGC</u> ATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'	NotI
39 ^R	35	5' <u>GCGGCCGCGG</u> ACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCCC 3'	

Construcción de 402-0-p69-1 (hGH) sec. con núm. de ident.: 36: MOD-4020 es la hormona de crecimiento humana recombinante silvestre (sin CTP) que se preparó para el uso como control en los experimentos descritos más abajo.

Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se llevó a cabo con el cebador 25 y el cebador 32^R y el ADN plasmídico de 0606114 (clon de hGH parcial de 1-242 pb) como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 245 pb.

La segunda reacción se llevó a cabo con el cebador 33 y el cebador 4^R y el ADN plasmídico de 401-0-p57-2 como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 542 pb.

5 La última reacción se llevó a cabo con los cebadores 25 y 4^R y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 705 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI-NotI que contenía la secuencia hGH-0 se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr. El vector se transfirió en células CHO DG-44. Las células se cultivaron en medio libre de proteínas.

10 *Construcción del 402-1-p83-5 (hGH-CTP) - sec. con núm. de ident.: 37 y 402-2-p72-3(hGH-CTPx2) - sec. con núm. de ident.: 38:* MOD-4021 es una hormona de crecimiento humana recombinante que se fusionó con 1 copia del péptido C-terminal de la cadena beta de la Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP de MOD-4021 se unió al C-terminal (un casete). MOD-4022 es una hormona de crecimiento humana recombinante que se fusiona con 2 copias del péptido C-terminal de la cadena beta de la Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los dos casetes de CTP de MOD-4022 se unieron al C-terminal (dos casetes).

15 La construcción de hGH-CTP y hGH-CTP-CTP se realizó del mismo modo que la construcción de hGH-0. pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH*-ctp) y pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH*-ctp x2) se usaron como plantillas en la segunda reacción de PCR.

20 MOD-4021 y MOD-4022 se expresaron en células CHO DG-44. Las células se cultivaron en medio libre de proteínas. El peso molecular de MOD-4021 es ~30,5 Kd ya que la hGH tiene un Peso Molecular de 22 Kd mientras que cada "casete de CTP" contribuye en 8,5 Kd al peso molecular total (ver la Figura 10). El peso molecular de MOD-4022 es ~39 Kd (ver la Figura 10).

25 *Construcción de 402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - sec. con núm. de ident.: 39 y 402-4-p82-9(CTP*hGH-CTP-CTP) - sec. con núm. de ident.: 40:* MOD-4023 es una hormona de crecimiento humana recombinante que se fusionó con 3 copias del péptido C-terminal de la cadena beta de la Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los tres casetes de CTP de MOD-4023 se unieron tanto al N-terminal (un casete) como al C-terminal (dos casetes). MOD-4024 es una hormona de crecimiento humana recombinante que se fusiona con 1 copia truncada y a 2 copias 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 al N-terminal y dos casetes de CTP se unieron al C-terminal (dos casetes).

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

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

40 *Construcción de 402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP) - sec. con núm. de ident.: 41:* La construcción de hGH-6 se realizó del mismo modo que la construcción de hGH-3. pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp) se usó como una plantilla en la segunda reacción de PCR.

45 *Construcción de 402-5-p96-4 (CTP-hGH) - sec. con núm. de ident.: 42:* La reacción de PCR se realizó mediante el uso del cebador 25 y el cebador 39^R y el ADN plasmídico de pCI-dhfr-ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8) como una plantilla; como un resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 763 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI-NotI que contenía la secuencia de ctp-hGH se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr para rendir el clon 402-5-p96-4.

Ejemplo 8

60 *Pruebas de bioactividad in vivo de los polipéptidos hGH-CTP de la presente invención*

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

65 Materiales y métodos

Las ratas hembras sometidas a hipofisectomía (60 -100 g) recibieron una inyección S.C. semanal de 21,7 µg de polipéptidos hGH-CTP o una inyección S.C. diaria de 5 µg de la rhGH comercial control.

- 5 El peso se midió en todos los animales antes del tratamiento, 24 horas después de la primera inyección y después cada un día hasta el final del estudio el día 21. Cada punto representa el porcentaje de ganancia de peso promedio del grupo ((Peso día 0-peso último día)/Peso día 0). La ganancia de peso promedio se normalizó contra la inyección una vez al día de hGH comercial. El programa de tratamientos se resume en la Tabla 10.

10

Tabla 10

Núm.	Fármaco	N	Ruta	Programa de tratamientos	Dosis equimolar (µg/rata)	Dosificación Acumulada (µg/rata)	Volumen 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 sec. con núm. de ident.: 36	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21.7	65	0.25
4	MOD-4021 sec. con núm. de ident.: 37	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21.7	65	0.25
5	MOD-4022 sec. con núm. de ident.: 38	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21.7	65	0.25
6	MOD-4023 sec. con núm. de ident.: 39	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21.7	65	0.25
7	MOD-4024 sec. con núm. de ident.: 40	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21.7	65	0.25
8	hGH v.1 comercial	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21.7	65	0.25
9	hGH v.1 comercial	7	s.c.	días 1-13; d/S	5	65	0.25

Resultados

- 15 Los resultados se resumen en la Figura 11. Estos resultados demuestran que MOD-4023 (sec. con núm. de ident.: 39) y MOD-4024 (sec. con núm. de ident.: 40) indujeron más del 120 % de ganancia de peso en comparación con rhGH comercial que indujo el 100 % de ganancia de peso.

Conclusión

- 20 3 dosis por semana (días de las inyecciones; 1, 7, y 13) de 21,7 µg de MOD-4023 (sec. con núm. de ident.: 39) y MOD-4024 (sec. con núm. de ident.: 40) indujeron un aumento de peso mayor del 30 % en ratas sometidas a hipofisectomía en comparación con la rhGH comercial inyectada a la misma dosis acumulada que se administró una vez al día a una dosis de 5 µg durante 13 días.

25 Listado de secuencias

<110> OPKO Biologics Ltd

<120> POLIPÉPTIDOS DE ACCIÓN PROLONGADA Y USOS DE ESTOS

30

<130> P-9520-EP9

<140> EP 14196333.0

<141> 2007-02-05

ES 2 663 365 T3

<150> EP 12179805.2
<151> 2007-02-05

5 <150> EP 07749922.6
<151> 2007-02-05

<150> US 60/764,761
<151> 2006-02-03

10 <160> 47

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
<211> 221
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 1

ES 2 663 365 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 2
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 663 365 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
245

5 <210> 3
<211> 277
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 3

ES 2 663 365 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg 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

5 <211> 387

ES 2 663 365 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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 Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Arg
 385

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

5

<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

10

ES 2 663 365 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
 210 215 220

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

<400> 6

10

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

ES 2 663 365 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
 245

<210> 7

<211> 25

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador directo para constructos de EPO-CTP

<400> 7

aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25

<210> 8

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Cebador directo para constructos de EPO-CTP

<400> 8

attgcgccg cggatccaga agaccttat tg 32

<210> 9

25 <211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Cebador inverso para constructos de EPO-CTP

<400> 9

taaattgg ggtgtccgag ggccc 25

35

<210> 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador directo para constructos de EPO-CTP
 <400> 10
 10 ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at 32
 <210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso para constructos de EPO-CTP
 20 <400> 11
 tgcggccgcg gatccttacc tgtcccctgt cctgc 35
 <210> 12
 <211> 17
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador directo para constructos de EPO-CTP
 30 <400> 12
 gcctgtctgt cggaagc 17
 <210> 13
 <211> 32
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador inverso para constructos de EPO-CTP
 <400> 13
 attgcgcccg cggatccaga agaccttat tg 32
 45 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador inverso para constructos de EPO-CTP
 <400> 14
 55 ctttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc 32
 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador directo para constructos de EPO-CTP
 <400> 15
 65 cctgggctcc tcttctcaa aggc 24

<210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador inverso para constructos de EPO-CTP
 <400> 16
 10 gcttccgaca gcagggc 17
 <210> 17
 <211> 34
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CTP
 20 <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
 Pro Gln
 25 <210> 18
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia de aminoácidos de CTP
 <400> 18
 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 20 25
 35 <210> 19
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 19
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
 20 25
 45 <210> 20
 <211> 786

ES 2 663 365 T3

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20

5

```
tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tctgcctgg ctgtggcttc tctgtccct      60
tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tctcaaagg cccctcccc      120
gagccttcca agtccatccc gactcccggg 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 cctgtctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt      420
ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg      480
ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc      540
tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgaaaact      600
cttccgagtc tactccaatt tctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg      660
caggacaggg gacagatcct ctctctcaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc      720
ccgactcccg gggccctcgg acaccccgat cctcccacaa taaaggtctt ctggatccgc      780
ggccgc                                          786
```

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

10

<400> 21

```
tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tctgcctgg ctgtggcttc tctgtccct      60
tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tctcaaagg cccctcccc      120
gagccttcca agtccatccc gactcccggg 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 cctgtctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt      420
ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg      480
ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc      540
tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgaaaact      600
cttccgagtc tactccaatt tctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg      660
caggacaggg gacagatcct ctctctcaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc      720
ccgactcccg gggccctcgg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc      780
tctccatcc ctgccatccc cctccgggct gcctggcccc tetgacaccc ctatcctgcc      840
tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc                                          873
```

15

ES 2 663 365 T3

<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
  
```

10

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

15

<400> 23

ES 2 663 365 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 210 215

5 <210> 24
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 24

ES 2 663 365 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

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

- 10 <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

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

- 20 <400> 26

ES 2 663 365 T3

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

Thr Thr Ala Leu Ser
20

- 5 <210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Cebador directo con sitios de restricción XbaI para constructos de HGH-CTP
- <400> 27
ctctagagga catggccac 19
- 15 <210> 28
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> Cebador inverso para constructos de HGH-CTP
- <400> 28
acagggaggt ctgggggttc tgca 24
- 25 <210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> tgcagaacct ccagacctcc ctgtgc
- <400> 29
tgcagaacct ccagacctcc ctgtgc 26
- 35 <210> 30
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> Cebador inverso para constructos de HGH-CTP
- 45 <400> 30
ccaaactcat caatgtatct ta 22
- <210> 31
<211> 19
- 50 <212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> Cebador directo con sitio de restricción XbaI para constructos de HGH-CTP
- 55 <400> 31
ctctagagga catggccac 19
- <210> 32
<211> 25
- 60

ES 2 663 365 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> Cebador inverso para constructos de HGH-CTP

<400> 32
cgaactcctg gtaggtgtca aaggc 25

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

15 <220>
<223> Cebador directo para constructos de HGH-CTP

<400> 33
gccttgaca cctaccagga gtgc 25

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

25 <220>
<223> Cebador inverso con sitio de restricción NotI para constructos de HGH-CTP

<400> 34
30 acgcgccgc atccagacct tcactactga ggc 33

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

<220>
<223> Cebador inverso para constructos de HGH-CTP

40 <400> 35
gcggccgagg actcatcaga agccgagct gcc 34

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

<400> 36

ES 2 663 365 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 2 663 365 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
 <213> Homo sapiens

10

<400> 38

ES 2 663 365 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln

- 5 <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

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

ES 2 663 365 T3

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

5 <211> 285

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

10

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

ES 2 663 365 T3

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

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
 5 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

10 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

ES 2 663 365 T3

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

<210> 42
 5 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

10 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

ES 2 663 365 T3

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

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

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

<400> 43

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

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

<400> 44

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg	60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct	120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac	180
catccccctg agcaggtgtg tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct	240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag	300
cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa	360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat	420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta	480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac	540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta	600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgcctg ctgaagaact acgggctgct	660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagacctc ctgaggatcg tgcagtgcag	720
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gccctcccc cgagcctgcc	780
ctccccaagc aggctgcctg ggcctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc	840
tggatgcggc cgc	853

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

10 <400> 45

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

ES 2 663 365 T3

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

5

<400> 46

```

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 agcttctctg agaaccacca gacctcctg tgcttcagcg agagcatccc      300
cacccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc      360
cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgcaa      420
cagcctgggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga      480
gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt      540
caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgcc tgctgaagaa      600
ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcttgaggat      660
cgtgcagtgc agaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggccctcc      720
cccgagcctg ccctcccaa gcaggctgcc tgggacctcc gacacaccaa tctgcccaca      780
gagcagctcc tctaaggccc ctctccatc cctgccatcc ccctccggc tgctggccc      840
ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgatg aaggtctgga tgcggccgc      889
    
```

10 <210> 47
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 47

```

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

ES 2 663 365 T3

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

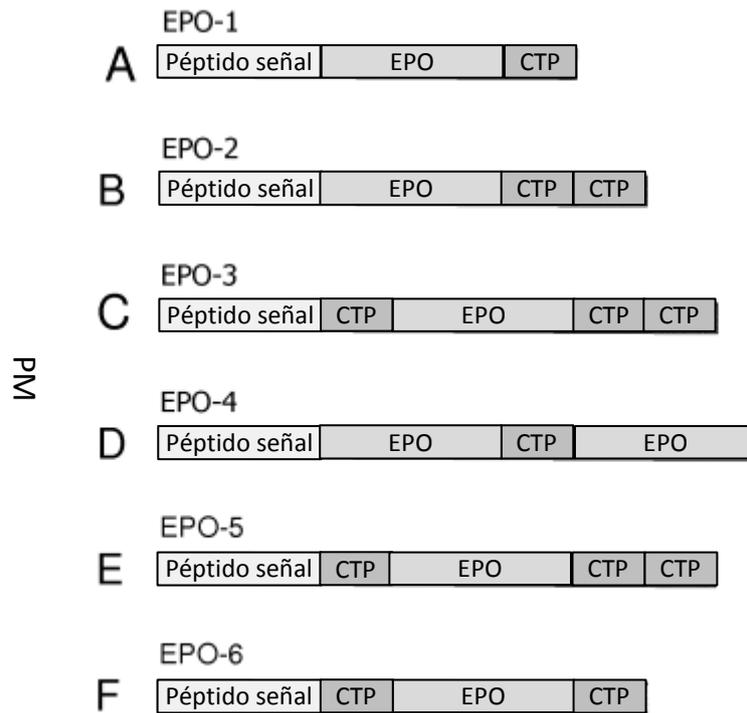
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 210 215

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido modificado con CTP que comprende un péptido de interferón-beta 1 (IFN β 1) y dos péptidos carboxi terminal de la gonadotropina coriónica, en donde el primer péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al amino terminal de dicho péptido de interferón-beta 1, y el segundo péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al carboxi terminal de dicho péptido de interferón-beta 1, en donde el péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, y en donde dicho péptido de interferón-beta 1 muestra actividad de interferón.
- 10 2. El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho péptido de interés se glicosila.
3. El polipéptido de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho péptido de interés no se glicosila.
- 15 4. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la secuencia de dicho péptido de interferón-beta 1 comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la Base de Datos de NCBI con núm. de Acceso NP_002167.1 o en la sec. con núm. de ident.: 24.
- 20 5. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la secuencia de al menos un péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencias expuestas en la sec. con núm. de ident.: 17 y la sec. con núm. de ident.: 18.
- 25 6. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la secuencia de cada péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 17, en donde dicho interferón-beta 1 (IFN β 1) es la forma madura de dicho IFN β 1 que carece de un péptido señal, y en donde el residuo de cisteína en la posición 17 de dicho IFN β 1 se sustituye por un residuo de serina, en donde la secuencia de aminoácidos resultante de dicho IFN β 1 Cys17Ser se expone en la sec. con núm. de ident.: 24.
- 30 7. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la secuencia de cada péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 18, en donde dicho interferón-beta 1 (IFN β 1) es la forma madura de dicho IFN β 1 que carece de un péptido señal, y en donde el residuo de cisteína en la posición 17 de dicho IFN β 1 se sustituye por un residuo de serina, en donde la secuencia de aminoácidos resultante de dicho IFN β 1 Cys17Ser se expone en la sec. con núm. de ident.: 24.
- 35 8. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde al menos un péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se glicosila.
- 40 9. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un péptido señal, en donde dicho péptido señal es N-terminal a la secuencia de CTP que es a su vez N-terminal al péptido de interferón-beta 1.
- 45 10. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde al menos un péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une a dicho interferón-beta 1 mediante un enlace peptídico.
- 50 11. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido, o una célula que comprende dicho vector de expresión.
- 55 12. Una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o que comprende el polinucleótido, vector de expresión o célula de conformidad con la reivindicación 11.
- 60 13. La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 12, en donde dicha formulación comprende además un amortiguador, tal como un amortiguador de citrato o acetato, y un agente de tonicidad, tal como cloruro sódico.
- 65 14. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde dicha formulación se formula para inyección en un recipiente multidosis, y opcionalmente, con un conservante, tal como cloruro de benzalconio o timerosal.
15. La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-14 que es una formulación líquida, en donde, opcionalmente, dicha formulación líquida se encuentra a un pH entre aproximadamente 6 a 7.

16. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 11, o la formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para el uso como un medicamento.
- 5 17. El polipéptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 11, o la formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, para el uso en el tratamiento de una afección viral o proliferativa en un sujeto.
- 10 18. El polipéptido, polinucleótido, o formulación para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha afección proliferativa es un melanoma maligno.
- 15 19. Un método para mejorar la vida media biológica de un péptido de interferón-beta 1, que comprende la etapa de unir un primer péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica al amino terminal de dicho péptido de interferón-beta 1 y un segundo péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica al carboxi terminal de dicho péptido de interferón-beta 1, lo que forma por lo tanto un polipéptido de interferón-beta 1 modificado con CTP, en donde el péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, y en donde se mejora la vida media biológica del interferón-beta 1 en el polipéptido de interferón-beta 1 modificado.
- 20 20. El método de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicho polipéptido de interferón modificado es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 25 21. Un método para producir un polipéptido de interferón-beta 1 modificado en CTP en una célula aislada, que comprende la etapa de transfectar dicha célula con un vector de expresión que comprende una porción codificante que codifica un polipéptido, dicho polipéptido que comprende un péptido de interferón-beta 1 y dos péptidos carboxi terminal de la gonadotropina coriónica, en donde el primer péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al amino terminal de dicho péptido de interferón-beta 1, y el segundo péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica se une al carboxi terminal de dicho péptido de interferón-beta 1, en donde el péptido carboxi terminal de la gonadotropina coriónica es de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana y comprende la secuencia de aminoácidos SSSSKAPPPS, lo que produce de esta manera un interferón-beta 1 modificado en CTP en una célula aislada.
- 30



FIGURAS 1A-F

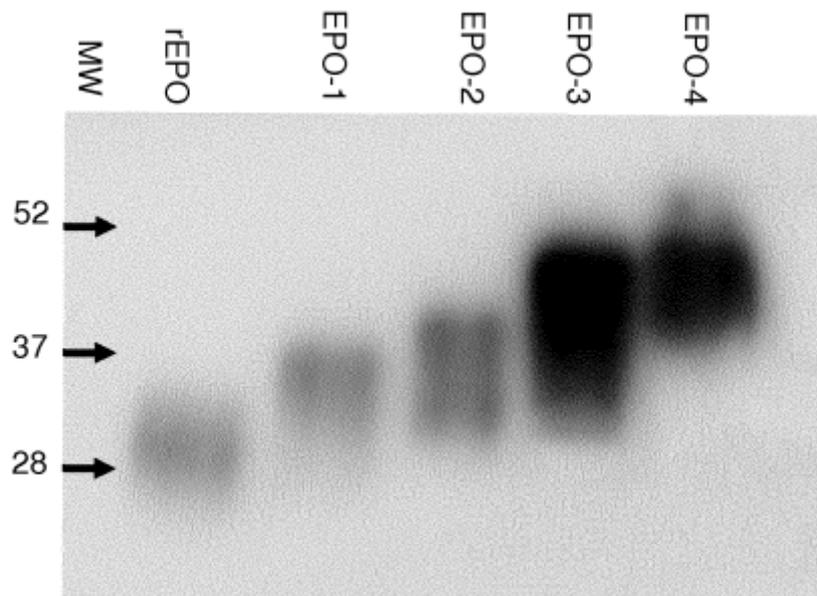


FIGURA 2

análisis de la actividad de EPO-CTP

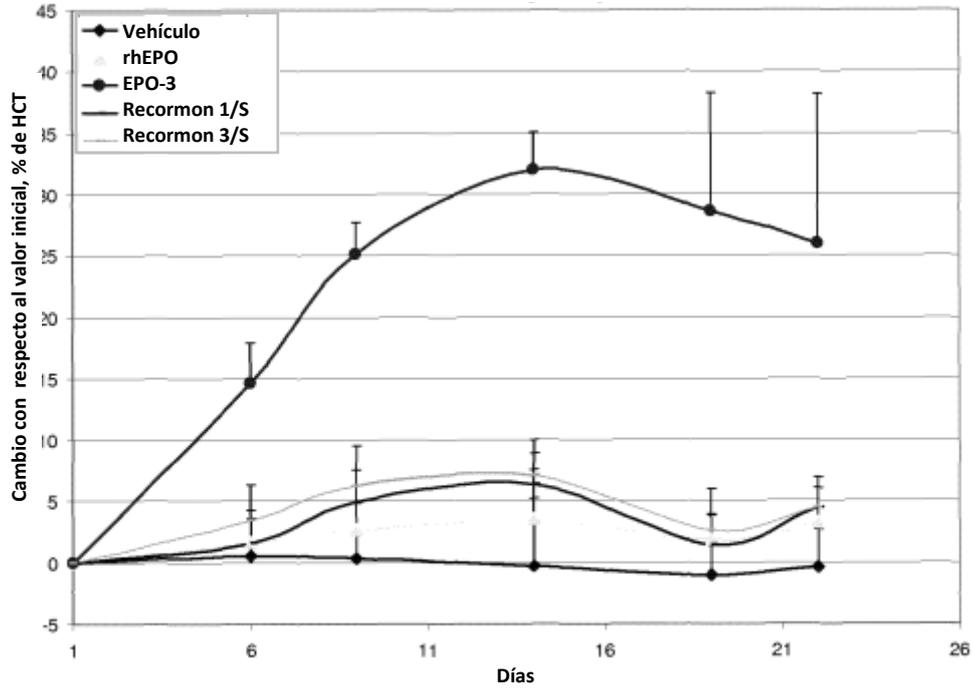


FIGURA 3

análisis de la actividad de EPO-CTP

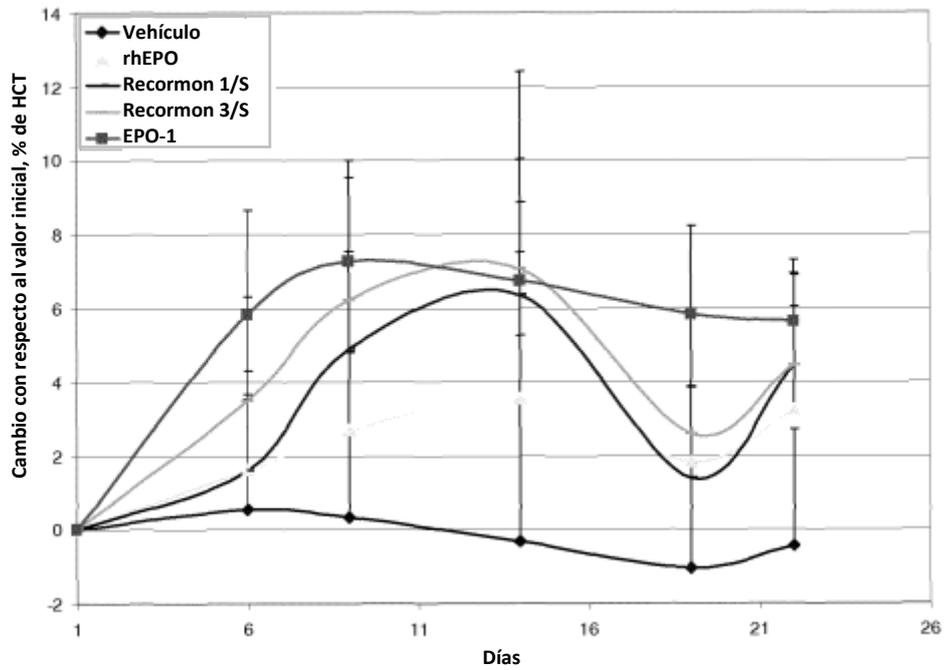


FIGURA 4

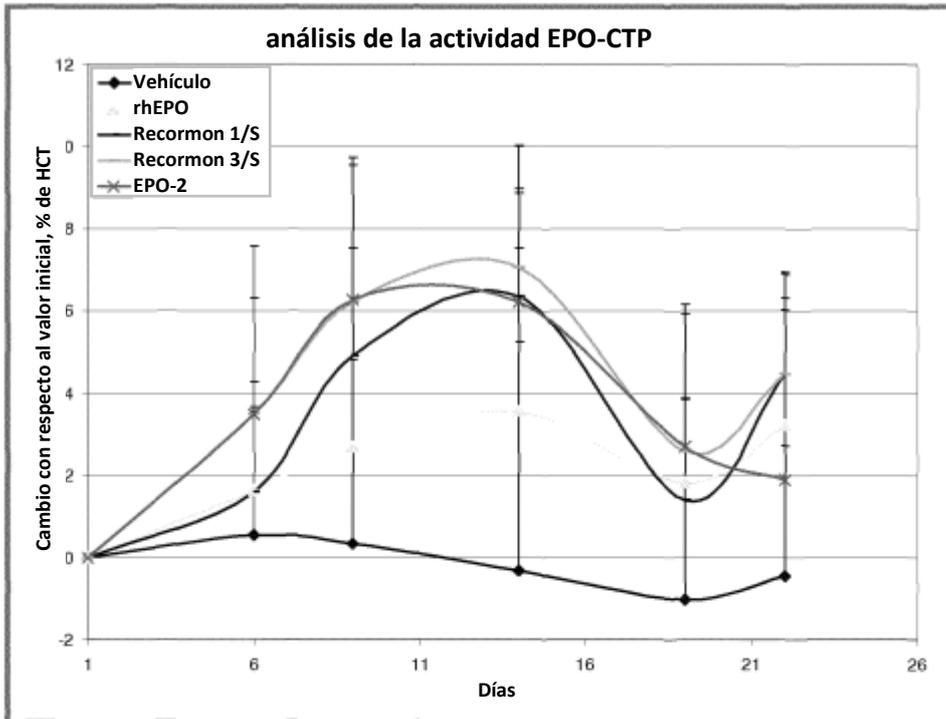


FIGURA 5

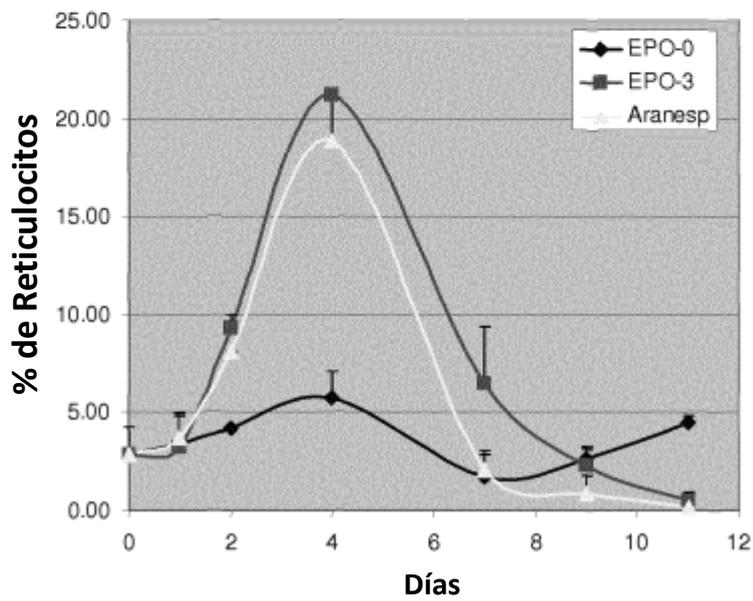


FIGURA 6

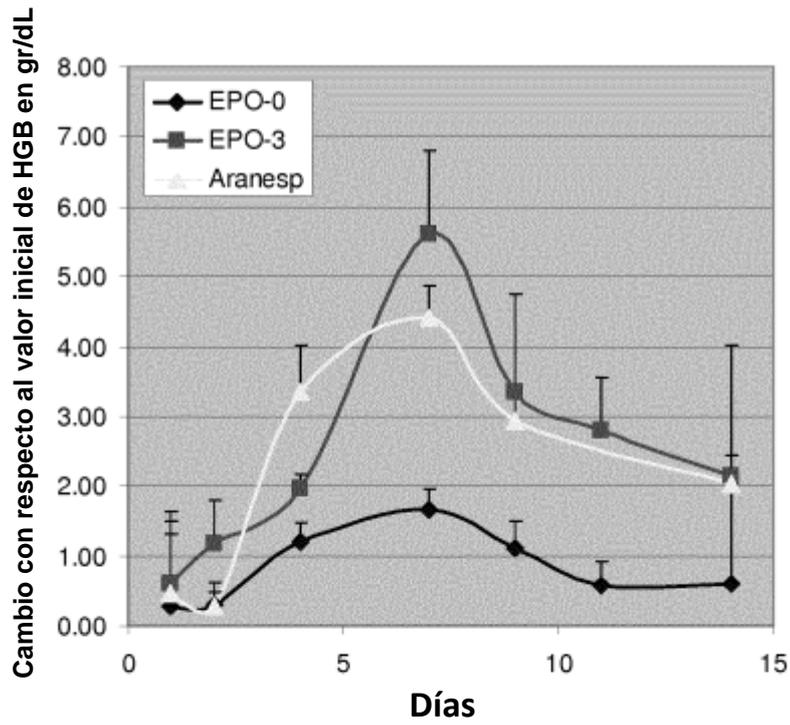


FIGURA 7

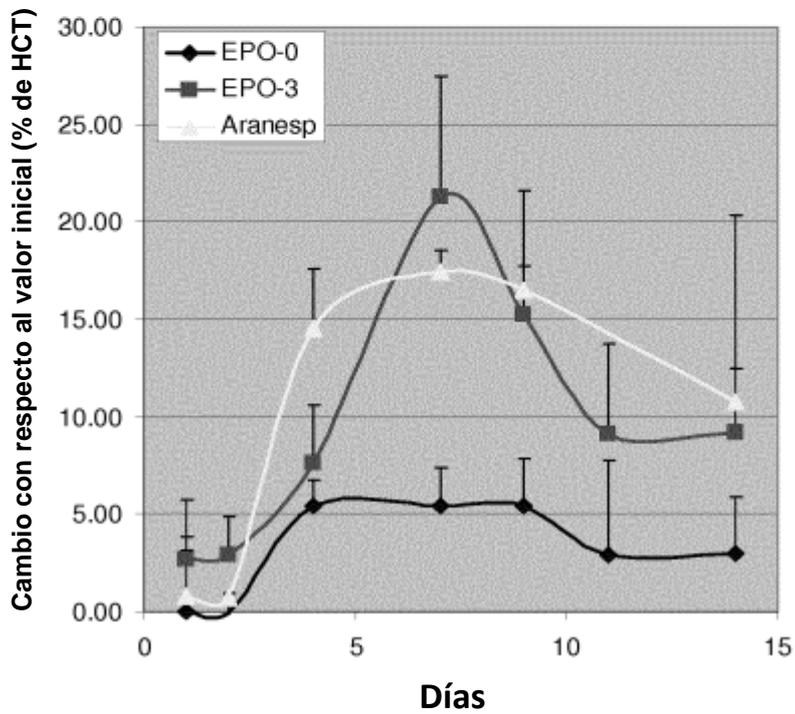


FIGURA 8

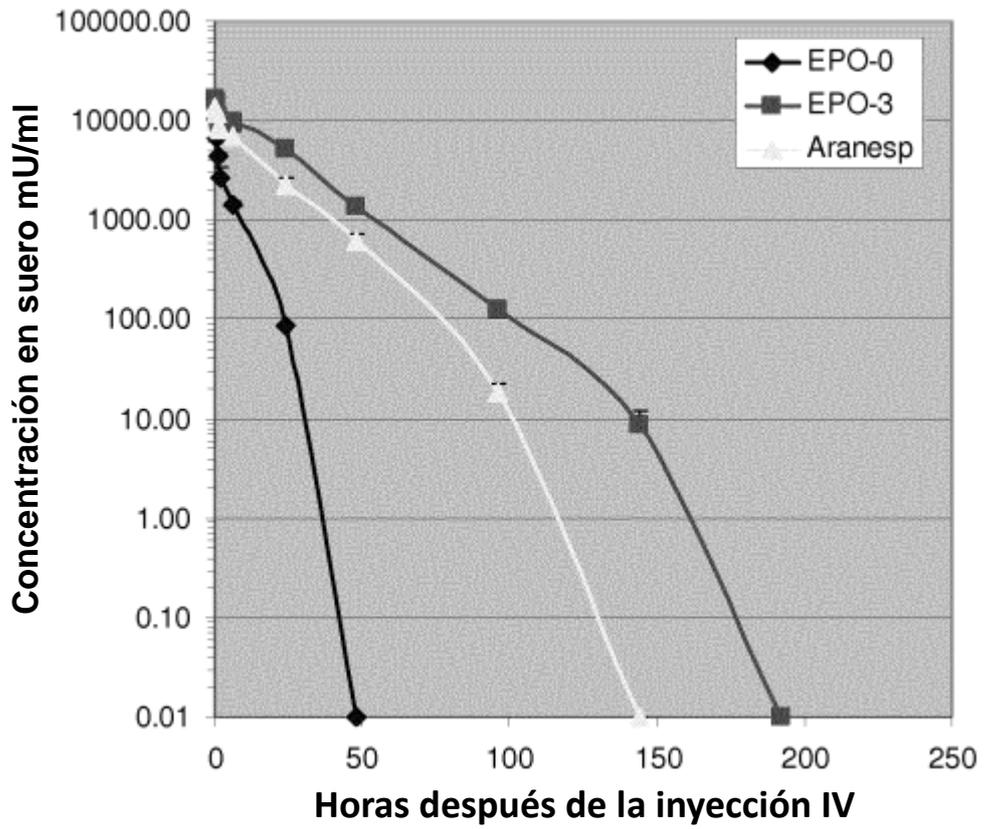


FIGURA 9

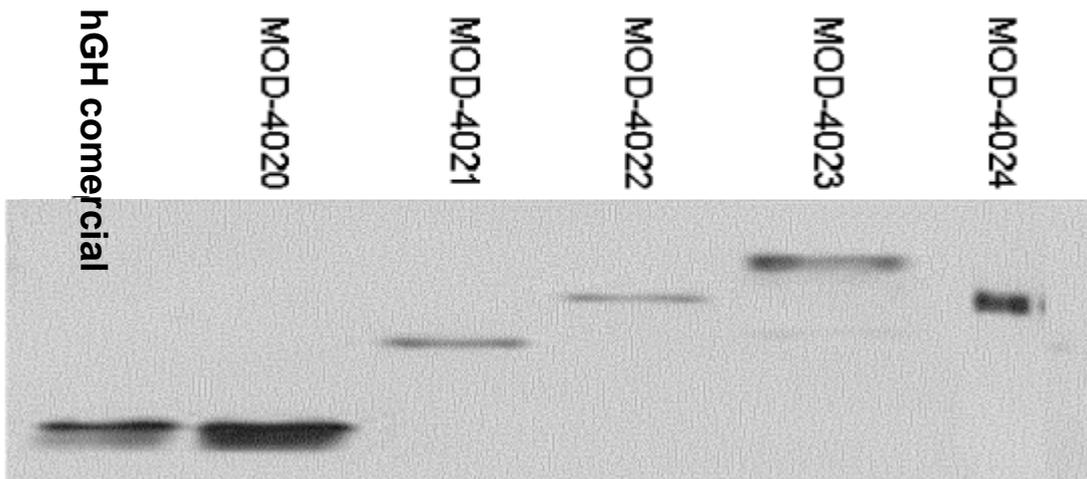


FIGURA 10

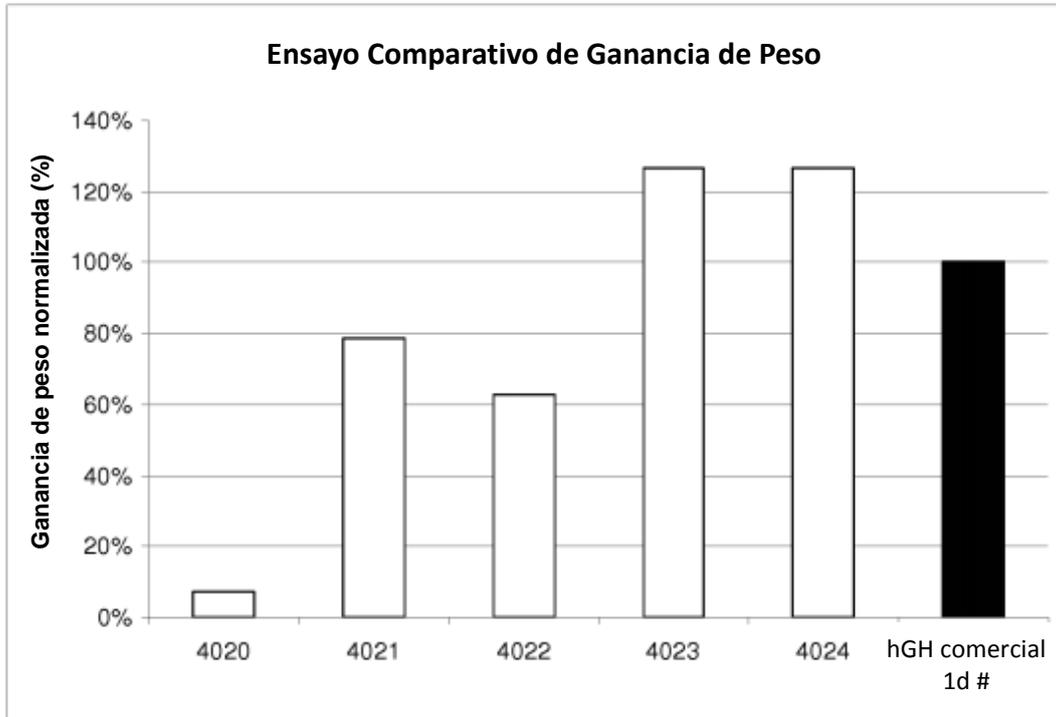


FIGURA 11