

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 631**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01) A61P 13/08	(2006.01)
A01H 5/00	(2008.01) A61P 15/12	(2006.01)
A01K 67/027	(2006.01) A61P 19/02	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01) A61P 25/04	(2006.01)
A61P 1/02	(2006.01) A61P 25/08	(2006.01)
A61P 1/10	(2006.01) A61P 25/16	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01) A61P 25/20	(2006.01)
A61P 9/12	(2006.01) A61P 25/24	(2006.01)
A61P 13/02	(2006.01) A61P 25/28	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2013** **PCT/JP2013/062685**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013** **WO13162050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2013** **E 13780579 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2842969**

54 Título: **Proteína de fusión de lactoferrina y método para la preparación de la misma**

30 Prioridad:

23.04.2012 JP 2012098085

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

07.06.2018

73 Titular/es:

NRL PHARMA, INC. (100.0%)
East Bldg., KSP 3-2-1 Sakado Takatsu-ku
Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012, JP

72 Inventor/es:

SATO, ATSUSHI y
KAGAYA, SHINJI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 671 631 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

Proteína de fusión de lactoferrina y método para la preparación de la misma

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una proteína de fusión de lactoferrina como se define mediante las reivindicaciones y que tiene propiedades mejoradas, usos de la misma y un método para la preparación de la misma.

10

Antecedentes

La lactoferrina es una glucoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 80.000, que se produce principalmente en la leche de mamífero y también se encuentra en neutrófilos, lágrimas, saliva, secreción nasal, bilis, semen, etc. El documento EP 1 932 855 A1 proporciona un complejo de lactoferrina con una molécula no peptídica muy hidrofílica. Debido a su capacidad de unión a hierro, la lactoferrina pertenece a la familia de la transferrina. Las actividades fisiológicas conocidas de la lactoferrina incluyen un efecto antibacteriano, un efecto regulador del metabolismo del hierro, un efecto de fomento de la proliferación celular, un efecto hematopoyético, un efecto antiinflamatorio, un efecto antioxidante, un efecto de aumento de la fagocitosis, un efecto antivírico, un efecto de fomento del crecimiento de bifidobacterias, un efecto anticanceroso, un efecto inhibidor de la metástasis de cáncer, un efecto inhibidor de la translocación y demás. Además, estudios recientes han indicado que la lactoferrina también tiene un efecto de mejora del metabolismo lipídico, un efecto analgésico o antiestrés, y un efecto antienvjecimiento. Como se describe anteriormente, la lactoferrina es una proteína multifuncional fisiológicamente activa que tiene una amplia gama de funciones y, por tanto, se espera para uso en, por ejemplo, aplicaciones farmacéuticas y/o alimenticias para el fin de restablecimiento o fomento de la salud. Los productos alimenticios que contienen lactoferrina ya están comercialmente disponibles.

Cuando se da por vía oral, la lactoferrina se hidrolizará por la acción de la pepsina, una proteasa ácida contenida en el jugo gástrico, y después se corta en péptidos. Por esta razón, las moléculas de lactoferrina son casi incapaces de alcanzar el tracto intestinal. Sin embargo, se sabe que los receptores de lactoferrina están presentes en la mucosa del intestino delgado en el caso del aparato digestivo, y estudios recientes han indicado que la lactoferrina se absorbe en el cuerpo a través del tracto intestinal y ejerce sus actividades biológicas. Por tanto, para ejercer las actividades biológicas de la lactoferrina, es importante asegurar que se deja que la lactoferrina alcance el tracto intestinal sin ser hidrolizada por la acción de la pepsina en el jugo gástrico. Además, cuando se formula en inyecciones, la lactoferrina se expondrá a corte catalizado por proteasas (por ejemplo, quimotripsina, elastasa) contenidas en tejidos y órganos, de modo que es prácticamente importante impartir resistencia contra estas proteasas para el fin de aumentar la estabilidad *in vivo* en tejidos y órganos donde se administra lactoferrina.

Se sabe que los anticuerpos IgG tiene una semivida larga en sangre porque se previene que sean cortados *in vivo* mediante un mecanismo de reciclado mediado por el receptor de Fc neonatal (de aquí en adelante denominado "FcRn"). Además, se considera que fármacos anticuerpos, cuyas dianas están limitadas a proteínas o péptidos específicos o similares y cuyos mecanismos de acción están, por tanto, limitados, como que tienen menos efectos secundarios que los compuestos sintéticos convencionales.

El concepto de formulaciones biológicas basadas en proteínas de fusión con un anticuerpo IgG o su región Fc se conoce por sí. A modo de ejemplo, como un agente para suprimir el rechazo a injerto agudo después de trasplante renal, un fármaco anticuerpo que se dirige a CD3 fue aprobado en 1986 y se ha usado durante un largo periodo de tiempo.

Sin embargo, en general, con frecuencia se observa que las proteínas de fusión tienen actividades biológicas reducidas cuando se comparan con proteínas no fusionadas. Esto es porque sus sitios activos han sido afectados como resultado de la fusión. A modo de ejemplo, cuando se compara con TPO endógeno, se encontró que los péptidos miméticos de unión a TPOR eran comparables en términos de niveles de unión a TPOR, pero tendían a tener actividades biológicas ligeramente menores cuando se ensayaron *in vitro*.

Además, en el caso de una proteína de fusión formada con IFN- α y la región Fc, que se diseñó para aumentar la semivida de IFN- α en sangre, la semivida en sangre se ha aumentado mucho, pero surge una desventaja en que las actividades fisiológicas del IFN- α se reducen. Por tanto, con respecto a condiciones y otras requeridas para la preparación de proteínas de fusión que tienen propiedades deseadas, se deben realizar suficientes estudios para cada proteína.

Documentos del estado de la técnica

Documentos de patente

65

Documento de patente 1: JP 2007-105044 A

Documento de patente 2: Patente japonesa No. 4234438

Documento de patente 3: JP 2001-523351 A

Documento de patente 4: JP 2004-521655 A

Documento de patente 5: Patente en los Estados Unidos No. 5.723.125

5

Documentos de no patente

Documento de no patente 1: Jazayeri, J. A. et al., *Biodrugs*, 22, 11-26 (2008)

Documento de no patente 2: Yeung, Y. A. et al., *J. Immunol.*, 182, 7663-7671 (2009)

10 Documento de no patente 3: Suzuki, T. et al., *J. Immunol.*, 184, 1968-1976 (2010)

Documento de no patente 4: Batra, J. K., et al., *Mol Immunol.*, 30, 379-386, (1993)

Documento de no patente 5: Dimitrov, D. S., *mAbs*, 1, 26-28 (2009)

Documento de no patente 6: Gong, R. et al., *J. Biol. Chem.*, 286, 27288-27293 (2011)

15 **Divulgación**

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La presente invención se dirige a proporcionar una proteína de fusión de lactoferrina muy clínicamente útil, que está configurada para tener antigenicidad reducida, para ser resistente contra proteasas, para permitir la administración oral, a tejidos y/o a órganos, y para tener tiempo de vida *in vivo* prolongado, así como un método para la preparación de la misma. Más específicamente, la presente invención se dirige a proporcionar una proteína de fusión de lactoferrina, que está configurada para retener las actividades biológicas de la lactoferrina natural, para tener tiempo de vida *in vivo* significativamente prolongado, y para ser más clínicamente útil que la lactoferrina natural y lactoferrina recombinante génica, así como un método para la preparación de la misma, etc.

25 Como resultado de esfuerzos amplios e intensivos hechos para diseñar lactoferrina que tiene una estructura de mayor orden comparable a la de la forma natural, en donde sus actividades fisiológicas no están dañadas y se mantiene una semivida larga, los inventores de la presente invención han encontrado que cuando la proteína lactoferrina se fusionaba con una proteína de unión a FcRn (región Fc) y se examinó su estabilidad en sangre, la proteína lactoferrina fusionada con la región Fc mostró un aumento significativo de 5,4 veces en su semivida cuando se comparó con el control no fusionado. Además, de los resultados de los espectros de CD y medida de la capacidad de unión a hierro, los inventores de la presente invención han encontrado resultados inesperados que la proteína de fusión no mostró cambio en la estructura tridimensional de lactoferrina por sí tras la fusión con la región Fc, y en términos de estabilidad al calor, la estructura tridimensional se mantiene a una temperatura de al menos 30°C o más alta, incluso a 65°C o mayor, y las actividades biológicas tampoco están alteradas en absoluto. Además, los inventores de la presente invención han obtenido los resultados que la proteína de fusión de lactoferrina preparada tiene resistencia contra proteasas y también retiene la capacidad de quelar hierro, que es la actividad biológica más importante. Estos descubrimientos llevaron a la conclusión de la presente invención.

40 Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Una proteína de fusión formada con lactoferrina y una proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn, que está representada por:

(LF-s-Y)_n o (Y-s-LF)_n

45 [en donde LF representa lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina, Y representa la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn, s representa cualquier secuencia de aminoácidos de 0 a 10 residuos, y n representa un número entero de 1 a 10, y en donde Y está libre de la región bisagra].

50 [2] La proteína de fusión según [1] anteriormente, en donde la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn comprende cualquiera de IgG, la cadena pesada de IgG, la región Fc de la cadena pesada de IgG, los dominios CH2 y CH3 de la región Fc, el dominio CH2 de la región Fc, albúmina o la región de unión a FcRn de albúmina.

[3] La proteína de fusión según [1] o [2] anteriormente, en donde la proteína de fusión es un monómero o dímero (n = 1 o 2).

55 [4] La proteína de fusión o variante de la misma según [1] o [2] anteriormente, en donde la proteína de fusión es un monómero.

[5] La proteína de fusión según cualquiera de [1] a [4] anteriormente, en donde la proteína de fusión retiene el 50% o más de la capacidad de quelar hierro de la lactoferrina natural o recombinante génica.

60 [6] La proteína de fusión según cualquiera de [1] a [5] anteriormente, en donde la proteína de fusión se absorbe a través del receptor de lactoferrina y/o el receptor de IgG/albúmina.

[7] La proteína de fusión según cualquiera de [1] a [6] anteriormente, en donde la proteína de fusión tiene resistencia a quimotripsina mejorada comparada con la lactoferrina natural o recombinante génica.

[8] Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión según cualquiera de [1] a [7] anteriormente.

[9] Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según [8] anteriormente.

65 [10] Una célula huésped que comprende el vector de expresión según [9] anteriormente.

[11] Un animal no humano genéticamente modificado que comprende la molécula de ácido nucleico según [8] anteriormente.

[12] Una planta genéticamente modificada que comprende la molécula de ácido nucleico según [8] anteriormente.

[13] Un agente terapéutico para enfermedades aliviadas por lactoferrina, que comprende la proteína de fusión según cualquiera de [1] a [7] anteriormente.

[14] Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión según cualquiera de [1] a [7] anteriormente y un soporte.

[15] Un método para preparar la proteína de fusión según cualquiera de [1] a [7] anteriormente, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un gen que codifica la proteína de fusión para expresar la proteína de fusión, y recoger la proteína de fusión de la célula huésped o el medio de la misma.

La proteína de fusión de la presente invención o una variante de la misma como también se describe en el presente documento (de aquí en adelante también se puede denominar "la proteína de fusión o similar") retiene la capacidad de unión a hierro de lactoferrina, y por tanto al menos retiene las actividades biológicas importantes de lactoferrina, que se basan en su capacidad de unión a hierro. Además, debido a tener un tiempo de vida *in vivo* prolongado y resistencia contra proteasas, la proteína de fusión o similar puede ejercer sus actividades biológicas *in vivo* durante un periodo de tiempo largo. Además, al estar configurada en la forma de una proteína de fusión, es menos probable que sea digerida y cortada con pepsina en el estómago y por tanto es capaz de alcanzar por completo el intestino sin requerir ningún tratamiento farmacéutico adicional para fines entéricos.

Además, al estar preparada mediante tecnología de recombinación genética, la proteína de fusión o similar descrita en el presente documento también es ventajosa en términos de control de fabricación y control de calidad, y por tanto es particularmente adecuada para uso como un ingrediente farmacéutico. Es decir, tal proteína de fusión o similar y un método para la preparación de la misma como se describe en el presente documento permite el suministro de lactoferrina en una forma más útil como un ingrediente farmacéutico. Puesto que lactoferrina es extremadamente segura y tiene una amplia gama de actividades biológicas, la presente invención permite la aplicación más ventajosa de lactoferrina como un agente terapéutico o profiláctico para enfermedades o síntomas para los que ningún agente terapéutico eficaz ha estado disponible. Por ejemplo, la aplicación de lactoferrina se puede ampliar a enfermedades relacionadas con estilo de vida (por ejemplo, arterioesclerosis, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, hipertensión, diabetes, hígado graso), cánceres (por ejemplo, prevención de carcinogénesis, prevención secundaria de cánceres, supresión de metástasis, efectos aumentados de agentes carcinoestáticos), enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, ojos secos y boca seca asociados con síndrome de Sjogren, artritis reumática, artritis reumatoide maligna, colagenosis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso sistémico), enfermedades psiconeuróticas (por ejemplo, demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, depresión, abstinencia, esquizofrenia, varias enfermedades inducidas por estrés, síntomas menopáusicos), alivio del dolor (por ejemplo, aumento de opioides tal como morfina, dolor de cáncer, dolor neuropático, dolor post-herpético, fibromialgia, dolor posoperatorio, glosodinia, dolor menstrual, dolor de muelas, artralgia, síntomas climatéricos), hepatitis (por ejemplo, varios tipos de hepatitis por virus, hepatitis no alcohólica, cirrosis), enfermedades intestinales inflamatorias (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), síndrome del intestino irritable, hiperplasia prostática benigna, micción frecuente, insomnio, estreñimiento y demás. Además, puesto que la lactoferrina tiene un efecto antibacteriano o antivírico y un efecto inmunoestimulante, la proteína de fusión de la presente invención o una composición farmacéutica que comprende la misma también se puede aplicar a varios tipos de infecciones y su inflamación asociada, como se ejemplifica por la infección de la mucosa gástrica con *Helicobacter pylori*, enfermedad periodontal, piorrea alveolar, ozostomia, candidiasis oral, estomatitis, queilitis angular, rinitis, esofagitis, colecistitis, infecciones del aparato urinario, infecciones vaginales, tiña del pie, acné, infecciones con virus del grupo herpes, neumonía senil, infecciones posoperatorias y demás, y también tiene el efecto de aumentar la acción de antibióticos. Por otra parte, la lactoferrina también actúa para proporcionar tolerancia inmunológica, y por tanto la proteína de fusión de la presente invención o una composición farmacéutica que comprende la misma también se puede aplicar a enfermedades alérgicas tal como polinosis, dermatitis atópica, seborrea, urticaria y demás. Notablemente, la lactoferrina tiene un fuerte efecto anti-estrés oxidativo basado en su efecto quelante de hierro, y por tanto la proteína de fusión de la presente invención o una composición farmacéutica que comprende la misma también se puede aplicar no solo a enfermedad de Wilson, hepatitis fulminante y demás, sino también a efectos antienvjecimiento y rejuvenecedor en la piel y ojos, degeneración macular senil, retinopatía diabética, efectos de antiqueratinización y rejuvenecimiento sobre células del epitelio de la mucosa, etc.

Además, la proteína de fusión de la presente invención se absorbe en células a través de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en los receptores de lactoferrina, los receptores de IgG y los receptores de albúmina, y por tanto se puede esperar que tenga menores efectos secundarios.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra una representación esquemática donde un oligonucleótido sintético que comprende un sitio BamHI se inserta en el vector pBSILfAL que comprende el ADNc de lactoferrina humana (hLF) de longitud completa para de esta manera preparar pBSILfAL/Bam.

[Figura 2] La figura 2 muestra la estructura del vector pTeulgG que lleva la secuencia genómica de la región Fc de IgG1 humana (bisagra, CH2, CH3), junto con la inserción del ADNc de hLF en este vector.

[Figura 3] La figura 3 muestra la estructura del vector pmlgG que lleva la secuencia de ADNc de la región Fc de IgG1 humana (CH2, CH3), junto con la inserción del ADNc de hLF en este vector.

[Figura 4] La figura 4 muestra una representación esquemática donde una región que cubre desde el sitio de unión al cebador T7 al sitio de unión al cebador T3 del vector pBluescript II (Stratagene) se inserta en pOpti-VEC, un vector de expresión para células DG44, para preparar de esta manera el vector pOpti-VEC-MS.

[Figura 5] La figura 5 muestra una representación esquemática de cómo preparar un vector de expresión de una proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) y un vector de expresión de una proteína deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc. Una región que comprende hLF y la secuencia genómica de la región Fc de IgG humana (bisagra, CH2, CH3) de pTeulgG/hLF o una región que comprende la secuencia del ADNc de la región Fc de IgG1 humana (CH2, CH3) de pmlgG/hLF se cortó como un fragmento XhoI-NotI y se clonó en el sitio XhoI/NotI de pOpti-VEC-MS.

[Figura 6] La figura 6 muestra los niveles de expresión obtenidos cuando células DG44 se indujeron a expresar la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc).

[Figura 7] La figura 7 muestra los niveles de expresión obtenidos cuando células DG44 se indujeron a expresar la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

[Figura 8] La figura 8 muestra la purificación de la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc).

[Figura 9] La figura 9 muestra la purificación de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

[Figura 10] La figura 10 muestra la concentración de la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) a través de precipitación con sulfato de amonio.

[Figura 11] La figura 11 muestra la concentración de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc a través de precipitación con sulfato de amonio.

[Figura 12-A] La figura 12 muestra la homología de estructura secundaria de hLF y las proteínas de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra y con bisagra añadida. El panel A muestra el espectro de CD obtenido para hLF.

[Figura 12-B] La figura 12 muestra la homología de estructura secundaria de hLF y las proteínas de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra y con bisagra añadida. El panel B muestra el espectro de CD obtenido para la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

[Figura 12-C] La figura 12 muestra la homología de estructura secundaria de hLF y las proteínas de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra y con bisagra añadida. El panel C muestra el espectro de CD obtenido para la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc).

[Figura 13-A] La figura 13 muestra la estabilidad al calor de hLF y las proteínas de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra y con bisagra añadida. El panel A muestra el espectro de CD obtenido para hLF.

[Figura 13-B] La figura 13 muestra la estabilidad al calor de hLF y las proteínas de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra y con bisagra añadida. El panel B muestra el espectro de CD obtenido para la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

[Figura 13-C] La figura 13 muestra la estabilidad al calor de hLF y las proteínas de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra y con bisagra añadida. El panel C muestra el espectro de CD obtenido para la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc).

[Figura 14] La figura 14 muestra el corte de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida.

[Figura 15-A] La figura 15-A muestra los productos de corte obtenidos a 37°C después de 3 semanas de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida.

[Figura 15-B] La figura 15-B muestra una vista esquemática de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida, junto con su sitio de corte.

[Figura 16] La figura 16 muestra la estabilidad en sangre de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

[Figura 17-A] La figura 17-A muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ IS NO: 5 en la lista de secuencias) de la proteína de fusión lactoferrina humana (hLF)/Fc de IgG humana codificada por el vector de expresión pOptiVEC/hLF-dFc. La sección de doble línea representa una secuencia de aminoácidos espaciadores, la sección en cursiva representa una secuencia de aminoácidos en la región bisagra, la sección en negrita subrayada representa una secuencia de aminoácidos en el dominio CH2, y la sección en negrita representa una secuencia de aminoácidos en el dominio CH3.

[Figura 17-B] La figura 17-B muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ IS NO: 6 en la lista de secuencias) de la proteína de fusión hLF/hlgGFc codificada por el vector de expresión pOptiVEC/hLF-mFc. La sección de doble línea representa una secuencia de aminoácidos espaciadores, la sección en negrita subrayada representa una secuencia de aminoácidos en el dominio CH2, y la sección en negrita representa una secuencia de aminoácidos en el dominio CH3.

[Figura 18] La figura 18 muestra la estabilidad de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc en una solución de suero.

[Figura 19] La figura 19 muestra la absorción de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc en células similares a epitelio del intestino delgado.

[Figura 20] La figura 20 es una fotografía de electroforesis que muestra la resistencia a quimotripsina de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

[Figura 21] La figura 21 muestra la resistencia a quimotripsina de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

[Figura 22] La figura 22 muestra la formación de homodímeros en una solución de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc.

Mejores formas para llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá ahora en más detalle a continuación. Las siguientes formas de realización se ilustran para describir la presente invención, y no se pretende limitar la presente invención solo a estas formas de realización. La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

La proteína de fusión de la presente invención es una proteína de fusión biológicamente activa formada con una proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn y lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina. En la proteína de fusión de la presente invención, tal proteína o péptido que se va a unir con lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina en general se refiere a una proteína o péptido que comprende una secuencia que se sabe se une a FcRn, y cualquier proteína o péptido se puede usar para este fin, siempre que sea biocompatible o farmacológicamente inerte. Por ejemplo, IgG o albúmina, que es una proteína componente de la sangre, se sabe que se unen a FcRn. Por tanto, los ejemplos de la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn que se va a usar en la presente invención incluyen las que comprenden IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgG7), la cadena pesada de IgG, la región Fc en la cadena pesada de IgG, los dominios CH2 y CH3 de la región Fc, el dominio CH2, albúmina, y la región de unión a FcRn de albúmina. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas y péptidos se conocen, y para su uso en la presente invención, pueden ser las mismas que sus secuencias naturales o pueden tener una mutación(es).

Preferiblemente, la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn que se va a usar en la presente invención debe ser resistente a corte del estado fusionado con lactoferrina. Por ejemplo, cuando se usa una región Fc de IgG que incluye una región bisagra, la región bisagra forma enlaces disulfuro para formar de esta manera una proteína de fusión en una forma dimérica. Sin embargo, la región bisagra es muy susceptible a proteasas. Por esta razón, es posible usar una región Fc de IgG que esté libre de la región bisagra o se ha modificado para sustituir la cisteína en la región bisagra con otro aminoácido o para cambiar la posición de cisteína. Alternativamente, la región bisagra se puede sustituir con una región bisagra derivada de un isotipo diferente que contiene un sitio de glucosilación para aumentar de esta manera la resistencia a proteasas mediante la presencia de cadenas glucídicas (documento de patente 2). Estas formas de realización también están en la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn.

Para prevenir el corte catalizado por proteasas de la región bisagra, una estrategia preferida es delecionar la región bisagra para preparar de esta manera una proteína de fusión deficiente en bisagra. Puesto que no tiene región bisagra, esta proteína de fusión tendría unión reducida a receptores Fcγ o complementos responsables para funciones efectoras, y es por tanto ventajosa sobre una proteína de fusión que tiene la región bisagra (por ejemplo, una proteína de fusión con bisagra añadida) en términos de reducir la citotoxicidad del daño celular mediada por funciones efectoras lo que produce efectos secundarios y/o reducir la activación de inmunorreacción mediada por funciones efectoras lo que produce la eliminación de la proteína de fusión de la sangre.

Tal proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn puede comprender otras secuencias además de la región de unión a FcRn. Por ejemplo, tras la adición de una secuencia que cubre la cadena J que forma un multímero (por ejemplo, IgA, IgM), es posible la multimerización de mayor orden.

En la proteína de fusión, la lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina y la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn pueden estar localizadas de modo que cualquiera de ellas puede estar localizada en el lado N-terminal o C-terminal de la otra, aunque se prefiere que la lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina esté localizada en el lado N-terminal, mientras la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn está localizada en el lado C-terminal. Por tanto, la proteína de fusión de la presente invención preferiblemente está representada por (LF-Y)_n y/o la fórmula que aparece en [1] anteriormente, en donde n = 1 o 2, y más preferiblemente representada por (LF-Y)_n, en donde n = 1. Se debe indicar que una secuencia adicional puede estar presente entre LF e Y, como se describe posteriormente.

"Lactoferrina" (LF) o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina que se va a usar en la proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento es lactoferrina recombinante génica (incluyendo una variante cuyos aminoácidos están parcialmente sustituidos), y no hay limitación ni sobre el tipo de organismo del que la secuencia usada deriva o sobre la presencia o ausencia de una modificación(es). Por ejemplo, la lactoferrina pretendida aquí puede tener la misma secuencia de aminoácidos que la lactoferrina natural obtenida de seres humanos y varios animales (por ejemplo, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, camello) o puede comprender delección parcial, adición o sustitución de aminoácidos siempre que tenga las actividades fisiológicas deseadas de lactoferrina. Se conocen varios candidatos para tal fragmento o péptido funcional (biólogicamente activo) de lactoferrina (véase, por ejemplo, "Programs and Abstracts of the 2nd Clinical Lactoferrin Symposium 2009," páginas 21 a 27 (Keiichi Shimazaki), Peptides. Sep 2011; 32(9):1953-63. Epub 30 Jul 2011, Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use, Brouwer CP, Rahman M, Welling MM, Biometals. Jun 2010; 23(3):493-505. Epub 18 Mar 2010, The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 primes monocytes for an enhanced TLR-mediated immune response, van der Does AM, Bogaards SJ, Jonk L, Wulferink M, Velders MP, Nibbering PH, J Agric Food Chem. 9 Jun 2010; 58(11):6721-7, Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides, Ruiz-Gimenez P, Ibanez A, Salom JB, Marcos JF, Lopez-Diez JJ, Valles S, Torregrosa G, Alborch E, Manzanares P), que se pueden diseñar según sea necesario.

En relación a la proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento, el término "actividad biológica" se pretende que signifique la actividad fisiológica o farmacológica de lactoferrina, a menos que se especifique de otra manera. En particular, la proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento tiene la misma capacidad de quelar hierro (unión) que la lactoferrina natural (o lactoferrina recombinante que tiene una secuencia equivalente a la de lactoferrina natural). Más específicamente, asumiendo que la capacidad de unión a hierro de la lactoferrina natural (o lactoferrina recombinante que tiene una secuencia equivalente a la de lactoferrina natural) se ajusta al 100%, medida en la manera descrita posteriormente en la sección de ejemplos, la proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento retiene al menos el 50% o más (por ejemplo, de aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 150% o de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 120%) de la capacidad de unión a hierro. La proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento puede tener capacidad de unión a hierro que corresponde desde aproximadamente el 70% hasta aproximadamente el 100% o más (por ejemplo, de aproximadamente el 70% hasta aproximadamente el 150% o desde aproximadamente el 70% hasta aproximadamente el 120%), más particularmente aproximadamente el 90% o más que la lactoferrina natural (o lactoferrina recombinante que tiene una secuencia equivalente a la de la lactoferrina natural). Se debe indicar que cuando se mide la capacidad de unión a hierro de la manera descrita en la sección de ejemplos o de una manera equivalente a la misma, puede haber un error de aproximadamente el ±20%.

La proteína de fusión de la presente invención puede comprender además una secuencia de aminoácidos adicional y/o una cadena glucídica, etc. La proteína de fusión de la presente invención puede tener cualquier secuencia de aminoácidos cuya longitud sea adecuada para uso como una secuencia espaciadora entre la proteína o péptido que comprende una región que se une a FcRn y lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina. Tal secuencia(s) espaciadora(s) puede ser, por ejemplo, cualquier secuencia de aminoácidos de 0 a 10 residuos o de 0 a 5 residuos. Otras secuencias adicionales pueden ser esas que proporcionan ventajas estructurales tridimensionales como en el caso de una secuencia espaciadora, o pueden ser esas que otorgan algún tipo de función a la proteína de fusión, como se ejemplifica por péptidos señal o secuencias etiqueta usadas para fines de purificación. Las proteínas de fusión que tienen estos elementos adicionales se denominan variantes.

La proteína fusión o similar como se describe en el presente documento se puede preparar por tecnología de recombinación génica. Un gen de lactoferrina que tiene una secuencia de aminoácidos deseada y un gen para la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn se pueden unir de una manera estándar para construir un vector de expresión que comprende otros elementos requeridos para la expresión en células huéspedes deseadas, y este vector se puede después introducir en las células huéspedes para expresar una proteína de fusión, seguido por recoger la proteína de fusión expresada de las células o medio.

Se puede diseñar y preparar una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento usando secuencias conocidas y técnicas de ingeniería genética estándar. Los

genes que codifican la lactoferrina y la proteína que comprende una región de unión a FcRn se pueden obtener clonándolos de varias genotecas genómicas o de ADNc comúnmente disponibles con el uso de sondas basadas en secuencias conocidas de ácidos nucleicos o aminoácidos o sintetizándolas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También es posible hacer las modificaciones deseadas a estos genes o introducir mutaciones en esos genes.

Se puede seleccionar un sistema células huésped-vector usado para la replicación de la molécula de ácido nucleico y un sistema huésped-vector usado para la expresión de la proteína de fusión según sea apropiado de entre muchos sistemas conocidos de células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, células vegetales, levaduras, células de insecto) y células procariotas (por ejemplo, bacterias).

Además de una secuencia que codifica lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina y una secuencia que codifica la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn (o alternativamente, una secuencia que codifica la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn y una secuencia que codifica lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina), el vector usado para expresar la proteína de fusión de la presente invención en general comprende, en un estado operativamente unido, un promotor de transcripción, una secuencia de péptido señal secretor, un terminador de transcripción, una señal de poliA y otros elementos, y habitualmente además comprende un marcador selectivo tal como un gen de resistencia a fármacos.

Estos vectores se pueden usar para transformar células huéspedes según varias técnicas conocidas.

La proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento se puede producir por plantas genéticamente modificadas y animales genéticamente modificados preparados para este fin. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención se puede integrar en el genoma del animal no humano (por ejemplo, oveja, cabra) para permitir de esta manera que la proteína de fusión de la presente invención se secrete en la leche. Alternativamente, tras la integración en plantas, es posible preparar plantas útiles que producen la proteína de fusión o similar como se describe en presente documento (véase, por ejemplo, el documento JP 2004-528022 A).

La proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento se puede aislar y purificar del medio o similar de células huéspedes transformadas con el vector de expresión de la presente invención usando precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel, y varias técnicas cromatográficas, según sea apropiado. Una técnica de purificación particularmente preferida es cromatografía de intercambio iónico.

La lactoferrina tiene una amplia gama de actividades fisiológicas incluyendo un efecto antibacteriano, un efecto regulador del metabolismo del hierro, un efecto de activación de la proliferación celular, un efecto hematopoyético, un efecto antiinflamatorio, un efecto antioxidante, un efecto de aumento de fagocitosis, un efecto antivírico, un efecto de fomento del crecimiento de bifidobacterias, un efecto anticáncer, un efecto inhibidor de la metástasis del cáncer, un efecto inhibidor de la translocación, un efecto de mejora del metabolismo lipídico, un efecto analgésico, un efecto antiestrés y demás, y estos efectos permiten el tratamiento (incluyendo mejora) y prevención de muchas enfermedades o síntomas incluyendo enfermedades relacionadas con el estilo de vida (por ejemplo, hipercolesterolemia, hiperlipidemia), control del dolor (por ejemplo, dolor por cáncer, dolor neuropático), colagenosis (por ejemplo, ojos secos y boca seca asociados con el síndrome de Sjorgren, artritis reumatoide), enfermedad periodontal, hepatitis C, etc.

La proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento retiene por completo las actividades biológicas de lactoferrina, y por tanto se puede administrar como un agente profiláctico o terapéutico para enfermedades contra las que lactoferrina es eficaz, sea sola o en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento se puede formular en composición farmacéuticas en formas farmacéuticas deseadas mezclándola con varios soportes, bases terapéuticamente inertes y/o aditivos conocidos en el campo farmacéutico. Por razones de comodidad, el término "preparación farmacéutica" o "composición farmacéutica" usado en relación con la presente invención se pretende que incluya no solo casos donde las dianas a las que se va a administrar son seres humanos, sino también casos donde las dianas que se van a administrar son animales (es decir, fármacos veterinarios y similares). Varios ingredientes, que pueden estar contenidos en tal composición farmacéutica, y posibles formas farmacéuticas los conocen bien los expertos en la materia.

La dosis eficaz de un agente terapéutico o composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión o similar como se describe en el presente documento variará dependiendo en el tipo o gravedad de la enfermedad o síntoma que se va a tratar o prevenir, el estado de una diana que se va a administrar, la forma farmacéutica pretendida, la ruta de administración y demás, y por tanto se puede seleccionar según sea apropiada basado en la dosis eficaz conocida de lactoferrina. En general, es posible seleccionar una dosis significativamente menor (por ejemplo, de 1/2 a 1/20, calculado como la cantidad de lactoferrina) en comparación con la dosis eficaz conocida de lactoferrina. Alternativamente, cuando se usa a la misma dosis, el agente terapéutico o composición farmacéutica se puede administrar a una frecuencia reducida.

Ejemplos

La presente invención se describirá adicionalmente en más detalle mediante los siguientes ejemplos y ejemplos de prueba, aunque la presente invención no está limitada solo al ámbito ilustrado en la sección de ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de una proteína de fusión formada con lactoferrina humana (hLF) y una región Fc de IgG humana que contiene la región bisagra, y evaluación de sus actividades biológicas

1. Clonación del gen de lactoferrina humana (hLF)

Se obtuvo el ADNc de lactoferrina humana (hLF) por PCR de una genoteca de ADNc humana (nombre comercial "Human Leukocyte Marathon-Ready cDNA", Clontech). Usando S_LFex_XhoI_ATG (SEQ ID NO: 1; 5'-CTCGAGATGAACTTGTCTTCCTCGTC (diseñado para introducir un sitio XhoI (subrayado) antes del codón de iniciación ATG) como cebador directo y usando AS_LFex_TAA_XbaI (SEQ ID NO: 2; 5'-TCTAGATTACTTCCTGAGGAATTCAC (diseñado para introducir un sitio XbaI (subrayado) después del codón de terminación TAA) como cebador inverso, el ADNc de hLF se amplificó con ADN sintetasa "KOD-plus" (nombre comercial, Toyobo Co., Ltd., Japón).

El fragmento de ADN resultante se sometió a adición de A y se clonó con un "vector de clonación TOPO TA" (nombre comercial, Invitrogen). A continuación, este vector se dirigió con XhoI y XbaI para cortar un fragmento de ADN del ADNc de hLF, que después se clonó en el vector "pBluescript II" (nombre comercial, Stratagene) que se había digerido con XhoI y XbaI. Este vector se designó como "pBSIfAL". La secuencia de nucleótidos del ADNc de hLF se confirmó por secuenciación con dideoxi. En pBSIfAL, el gen de hLF de longitud completa se clonó en un estado emparejado entre sitios de enzimas de restricción XhoI y XbaI en el vector. La estructura de pBSIfAL se muestra en la figura 1 (panel izquierdo).

El vector pBSIfAL así preparado que lleva el gen de hLF de longitud completa se usó para preparar un vector, pBSIfAL/Bam, en el que se introdujo un sitio BamHI entre EcoRI y XbaI localizado en el lado 3'-terminal del gen de hLF. Se proporcionaron los oligonucleótidos sintéticos Eco_hLF_Bam-S (SEQ ID NO: 3; 5'-AATTCCTCAGGAAGGATCCT-3') y Eco_hLF_Bam-A (SEQ ID NO: 4; 5'-CTAGAGGATCCTTCCTGAGG-3') y cada uno disuelto en agua esterilizada a una concentración de 100 µM. A continuación, los reactivos indicados en la tabla 1 siguiente se mezclaron para preparar una solución de muestra.

Tabla1

Eco_hLF_Bam-S 100 µM (µl)	10
Eco_hLF_Bam-A 100 µM (µl)	10
Tris HCl 1 M (pH 7,5) (µl)	0,8
NaCl 5 M (µl)	0,8
Agua esterilizada (µl)	20,4
Total (µl)	42

Esta solución de muestra se calentó a 70°C y después se enfrió lentamente a temperatura ambiente para producir de esta manera hibridación y formación de ADN bicatenario (oligo de hibridación). Se proporcionó pBSIfAL (10 ng/µl), que se había digerido completamente con EcoRI y XbaI, y los reactivos indicados en la tabla 2 a continuación se mezclaron para producir ligación a 16°C durante 30 minutos.

Tabla 2

Oligo de hibridación (µl)	2
pBSIfAL (µl)	5
Ligation High (TOYOBO)	7
Total (µl)	14

Esta solución de ligación (5 µl) y células competentes TOP10 (50 µl) se mezclaron e incubaron en hielo durante 30 minutos. A continuación, las células competentes se trataron por choque térmico a 42°C durante 40 segundos y se dejaron reposar en hielo durante 2 minutos, seguido por adición de medio SOC (100 µl) e incubación a 37°C durante 1 hora. La muestra incubada durante 1 hora se sembró en medio LB agar que contenía ampicilina y se cultivó durante la noche a 37°C. Al día siguiente, las colonias resultantes se cultivaron durante la noche con agitación en 1,5 ml de medio líquido LB (que contenía ampicilina 100 µg/ml) en condiciones de 37°C y 200 rpm.

La extracción del ADN plasmídico se realizó con un "QIAprep Spin Miniprep Kit" (nombre comercial, QIAGEN). La ligación entre el oligo de hibridación y pBSIfAL se confirmó decodificando la secuencia de nucleótidos cerca del oligo de hibridación. El vector así preparado se designó como pBSIfAL/Bam (figura 1, panel derecho).

2. Construcción de un vector de expresión de la proteína de fusión hLF/hlgGFC que contiene la región bisagra

2-1 Construcción de pTeulg/hLF

Se construyó un vector de expresión para permitir que células animales expresaran una proteína de fusión (hLF/hlgGFc) formada con hLF y Fc de IgG humana (hlgGFc) en un estado dimerizado en la región bisagra a través de enlaces disulfuro (s-s) (que también se puede denominar proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc)).

Un fragmento XhoI-BamHI de pBSIlfAL/Bam se clonó en el sitio XhoI/BamHI de pTeulgG (figura 2), que es un vector de expresión que tiene la secuencia genómica de la bisagra, CH2 y CH3 de la región Fc de IgG humana. Este vector de expresión de la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) se designó como pTeulgG/hLF. La preparación del vector de expresión se logró de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Se debe indicar que pTeulgG se construyó de modo que una secuencia de ADN genómico correspondiente a las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana se introdujo después del promotor de expresión fuerte SR α (Sato, A. et al., Biochem. J. 371, 603-608 (2003)).

Para la construcción de una línea celular que expresa establemente la proteína de fusión hLF/hlgGFc, se usaron células de ovario de hámster chino deficientes en DHFR (DG44), un tipo de células CHO. DHFR se refiere a dihidrofolato reductasa y es esencial para la biosíntesis de ácidos nucleicos. Cuando las células se cultivan en presencia de metotrexato (MTX) que sirve como un antagonista de DHFR, la producción de DHFR se inhibe. En este estado, se sabe que las células amplifican el gen de DHFR para su supervivencia, como resultado de lo cual los genes localizados cerca del gen DHFR también se amplifican y la expresión de proteínas de estos genes por tanto se amplifica. De esta manera, una proteína diana se puede expresar mucho.

Como vector de expresión para células DG44, se usó pOptiVEC (nombre comercial, Invitrogen). Una región que cubre desde el sitio de unión del cebador T7 hasta el sitio de unión del cebador T3 del vector pBluescript II (nombre comercial, Stratagene) se amplificó por PCR y se ligó a un pOptiVEC por clonación TA para preparar el vector pOptiVEC-MCS (figura 4).

Para la construcción del vector de expresión de la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc), una región que incluía las secuencias genómicas de hLF y la región Fc de IgG humana (bisagra, CH2, CH3) se cortó como un fragmento XhoI-NotI del vector pTeulgG/hLF y se clonó en el sitio XhoI/NotI de pOptiVEC-MCS. Este vector se designó como pOptiVEC/hLF-dFc (figura 5). La preparación del vector de expresión se logró de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión lactoferrina humana (hLF)/Fc de IgG humana codificada por el vector de expresión de la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) pOptiVEC/hLF-dFc se muestra en SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias. En SEQ ID NO: 5, los aminoácidos 1 a 711 corresponden a la secuencia de aminoácidos para hLF, los aminoácidos 712 a 714 corresponden a una secuencia de aminoácidos para un espaciador, los aminoácidos 715 a 729 corresponden a una secuencia de aminoácidos para la región bisagra, los aminoácidos 730 a 839 corresponden a la secuencia de aminoácidos para el dominio CH2, y los aminoácidos 840 a 946 corresponden a la secuencia de aminoácidos para el dominio CH3 (figura 17A: basado en las secuencias con números de registro de Genbank AAB60324.1 y AAA02914.1).

3. Expresión y purificación de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida

3-1. Construcción de una línea celular que expresa establemente la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida usando células DG44 como huésped

El pOptiVEC/hLF-dFc así preparado se introdujo en células DG44 para establecer una línea celular que expresa establemente la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc). Para la introducción eficaz del vector de expresión en las células, se linealizaron 20 μ g del vector por tratamiento con enzima de restricción con PvuI. Esta muestra se suplementó con 1 volumen de fenol/cloroformo y se agitó con un mezclador (Vortex) para eliminar proteínas. Después de centrifugar a 15000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El sobrenadante se suplementó con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, seguido por centrifugación a 15000 rpm durante 20 minutos para precipitar el vector. Después de la eliminación del sobrenadante, el tubo se enjuagó por adición de etanol al 70% (100 μ l). A continuación, el tubo se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante, seguido por secado al aire durante 10 minutos. Al tubo secado al aire, se añadió agua esterilizada (15 μ l) para resuspender el vector de expresión. El vector de expresión tratado con PvuI se designó pOptiVEC/hLF-dFc/PvuI.

El pOptiVEC/hLF-dFc/PvuI se usó para transfectar células DG44. Se mezclaron 20 μ g de pOptiVEC/hLF-dFc/PvuI con 15 μ l de "Free Style MAX Reagent" (nombre comercial, Invitrogen) y con 1200 μ l de "Opti Pro SFM" (nombre comercial, Invitrogen), y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se asumió a una solución de transfección. Se resuspendieron células DG44 (15×10^6 células) en 30 ml de medio ("medio CD DG44 completo", Invitrogen) y la solución de transfección preparada por adelantado se mezcló en ellas, seguido por cultivo en un incubador de CO₂ (37°C, CO₂ al 5%) durante 48 horas. A continuación, el "medio CD DG44 completo" se

sustituyó con “medio CD opti CHO completo” (Invitrogen). Este medio es un medio libre de hipoxantina y timidina en el que las células deficientes en DHFR no pueden crecer. Por otra parte, el vector de expresión tratado con la enzima de restricción PvuI codifica el gen DHFR, de modo que las células DG44 podrán crecer cuando el vector de expresión se integra en su cromosoma. Las células después de 48 horas desde la transfección se recogieron por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 30 ml de “medio CD opti CHO completo” (3×10^6 células/ml). A continuación, mientras se repite la sustitución de medio cada 2 días, las células se cultivaron en un incubador de CO₂ (37°C, CO₂ al 5%). El cultivo se siguió hasta que la densidad celular alcanzó el 90% o más de la densidad celular inicial al principio de cultivo.

A continuación, se realizó la amplificación del genoma intracelular con metotrexato (MTX, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón). Las células DG44 cultivadas en “medio CD opti CHO completo” se contaron y $1,2 \times 10^7$ células se centrifugaron después a 400 x g durante 5 minutos. Estas células se resuspendieron en un medio mezcla que contenía 30 ml de “medio CD opti CHO completo” y 1,5 µl de MTX 1 mM (concentración final: 0,05 µM). A continuación, las células se cultivaron en un incubador de CO₂ (37°C, CO₂ al 5%) hasta que la densidad celular alcanzó el 90% o más de la densidad celular inicial al principio del cultivo. Posteriormente, la concentración de MTX se aumentó a 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM y 4 µM de una manera escalonada y se repitió el cultivo.

3-2. Confirmación de la expresión de una proteína de fusión hLF/hlgGfC con bisagra añadida

Las células ($1,2 \times 10^7$ células) se resuspendieron en “medio CD opti CHO completo” que contenía MTX a cada concentración (0 µM, 0,05 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM o 4 µM) y se cultivaron en un incubador de CO₂ (37°C, CO₂ al 5%) hasta que la densidad celular alcanzó el 90% o más de la densidad celular inicial al principio del cultivo. En este punto, las células se precipitaron por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos para recoger su sobrenadante. Se mezclaron 15 µl del sobrenadante con 5 µl de tampón de carga 4 x no reductor (preparado a partir de 2 ml de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 0,8 g de laurilsulfato de sodio (Nacalai Tesque, Inc., Japón) y 4 ml de glicerina (Wako), que se mezclaron y ajustaron a 10 ml con agua pura), y después se trataron calentando a 95°C durante 5 minutos y se analizaron por SDS-PAGE al 7,5%. Para la tinción de bandas se usó CBB.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. El peso molecular de la proteína deseada, d(hLF/hlgGfC) es aproximadamente 210 kDa. Cuando la concentración de metotrexato alcanzó 1 µM, se observó una banda alrededor de aproximadamente 210 kDa indicada con la flecha. Con el aumento en la concentración de MTX, la banda era más fuerte, confirmando de esta manera que el nivel de expresión de la proteína aumentaba.

La línea celular establecida en presencia de MTX a una concentración de 4 µM se designó como DG44-d(hLF/hlgGfC).

3-3. Expresión a gran escala de la proteína de fusión hLF/hlgGfC con bisagra añadida

La expresión a gran escala se logró por cultivo estático usando una botella T de 175 cm² (Greiner, usando 50 ml de medio) o una botella triple Nunc (usando 200 ml de medio). La línea celular que expresa establemente la proteína de fusión con bisagra añadida se subcultivó en el medio sin suero “medio CD opti CHO completo”. Para la expresión de proteínas, el medio se sustituyó con el “Medio sin suero de hibridoma” (nombre comercial, Invitrogen) + metotrexato (MTX) 4 µM + prolina 60 µg/ml (de aquí en adelante denominado “Hybridoma SFM”), y las células se sembraron a una densidad celular de 1×10^6 células/ml y se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 7 días. Después de 7 días, el medio de cultivo celular se separó en fracciones de sobrenadante y celular por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 50 ml de Hybridoma SFM y se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% durante una semana adicional para producir la expresión de proteínas. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 8000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante resultante se suplementó con azida sódica a una concentración final del 0,02% y se almacenó a 4°C.

3-4. Purificación de la proteína de fusión hLF/hlgGfC con bisagra añadida

Para la purificación, el sobrenadante de cultivo (que contenía azida sódica a una concentración final del 0,02%) obtenido por expresión a gran escala se usó directamente. Se cargaron 400 µl de “MacroCaP SP” (nombre comercial, GE Healthcare) que sirve como soporte de intercambio catiónico en “columnas de cromatografía Poly-Prep” (nombre comercial, BioRad Laboratories) y se equilibraron con 5 volúmenes de columna (VC) de tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,6). El tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,6) usado para equilibrar se desechó, y 4 ml del sobrenadante de cultivo obtenido por expresión a gran escala se añadieron después y se hicieron reaccionar en un agitador basculante durante 30 minutos. Después de la reacción, la solución se recogió como fracción no retenida. Las “columnas de cromatografía Poly-Prep” se conectaron a un “DETECTOR UV” (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japón, medida para absorbancia a 280 nm) y una bomba de microtubo (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japón). La velocidad de flujo de la bomba se ajustó a 1 ml/min, y se pasó tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,6) para lavar el soporte. A partir de un punto de tiempo donde la absorbancia a 280 nm en el “DETECTOR UV” empezó a aumentar, el eluato se recogió (fracción de lavado). Esta recogida de eluato siguió hasta que la absorbancia a 280 nm fue 0. A continuación, la solución se sustituyó con NaCl 0,2 M + tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,6), y se repitieron las mismas operaciones (fracción eluida con NaCl 0,2 M). Esta serie de operaciones se repitió al tiempo que se

aumentaba la concentración de NaCl en incrementos de 0,1 M hasta NaCl 1,0 M. Los eluatos recogidos se almacenaron cada uno a 4°C.

Se mezclaron 15 µl de cada fracción eluida con 5 µl de tampón de carga 4x no reductor, se trataron calentando a 95°C durante 5 minutos y se analizaron por SDS-PAGE al 7,5%. Para la tinción de bandas se usó CBB.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8. Se encontró que la proteína deseada con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) eluía de la fracción de NaCl 0,4 M. Este resultado indicaba que la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) unida a "MacroCaP SP" se podría recoger eficazmente siendo lavada con NaCl 0,3 M y eluida con NaCl 1,0 M.

3-5. Concentración de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida mediante precipitación con sulfato de amonio

Para dar el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90% de saturación de sulfato de amonio, se pesó sulfato de amonio con una balanza microelectrónica en cantidades por ml de 0,113 g, 0,176 g, 0,242 g, 0,314 g, 0,390 g, 0,472 g, 0,561 g y 0,657 g, respectivamente, y se introdujeron en tubos de 2 ml. A los tubos respectivos, se añadió una solución de la proteína d(hLF/hlgGFc) con bisagra añadida purificada con un soporte de intercambio catiónico y resuspendida en PBS en volúmenes de 1 ml y se mezcló por inversión hasta que el sulfato de amonio se disolvió, y los tubos después se dejaron reposar durante la noche a 4°C. A continuación, los tubos se centrifugaron en condiciones de 15000 rpm durante 30 minutos para precipitar la proteína. Los sobrenadantes se recogieron, y los precipitados se disolvieron cada uno en 100 µl de PBS. Cada precipitado disuelto en PBS y cada sobrenadante recogido se analizaron por SDS-PAGE al 7,5% y tinción con CBB.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10. Se observó precipitación del 50% al 90% de saturación de sulfato de amonio. Además, se midió la concentración de proteínas en las fracciones que mostraron precipitación del 50% al 90% de saturación de sulfato de amonio en solución por el ensayo de Bradford (ensayo de proteínas, BioRad Laboratories) usando BSA de concentración conocida como un estándar para calcular la tasa de recuperación en precipitación con sulfato de amonio (n = 5). En el caso de la proteína de fusión hlgGFc, la concentración como hLF se calculó usando su peso molecular. Más específicamente, en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc), al cálculo se realizó asumiendo que el peso molecular de hLF era 80 kDa (x 2) y el peso molecular de la región Fc era 50 kDa. En el caso de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc, el cálculo se realizó asumiendo que el peso molecular de hLF era 80 kDa y el peso molecular de la región Fc era 25 kDa. Cada concentración de sulfato de amonio y la tasa de recuperación (%) obtenida en la misma se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Concentración saturada de sulfato de amonio	Tasa de recuperación (%)
50%	31 (± 14,4)
60%	75 (± 10,5)
70%	79 (± 3,7)
80%	72 (± 3,7)
90%	69 (± 8,1)
n = 5 (± E.E.)	

La tasa de recuperación fue la más alta a sulfato de amonio al 70%. Después de la precipitación con sulfato de amonio, el precipitado se resuspendió en PBS y se dializó frente a PBS para eliminar el sulfato de amonio.

4. Medida de actividades biológicas

4-1. Medida de capacidad de unión a hierro de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida

Lactoferrina es una glucoproteína que se une a hierro no hemo que tiene un peso molecular de 80.000, que está compuesta de dos regiones llamadas lóbulo N y lóbulo C, y tiene la capacidad de formar enlaces quelatos reversibles con dos iones hierro (Fe^{3+}) por molécula de proteína en presencia de iones carbonato (CO_3^{2-}) (Anderson, et al., Nature, 344, 784-78 (1990)). La capacidad de unión a hierro de lactoferrina se midió como sigue. Se liberan iones hierro (Fe^{3+}) de lactoferrina holoforma para preparar lactoferrina apoforma. A continuación, se añadieron iones hierro (Fe^{3+}) en presencia de iones carbonato (CO_3^{2-}) para preparar lactoferrina vuelta a unir a hierro. La lactoferrina apoforma y la lactoferrina vuelta a unir a hierro preparadas de esta manera se midieron para su contenido en hierro y concentración de proteína para determinar la cantidad de hierro unida a la misma. Más específicamente, la lactoferrina apoforma se preparó como sigue: LF humana recombinante derivada de *Aspergillus* o la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) se dializaron frente a tampón citrato 0,1 M (pH 2,1) durante 24 horas y se dializaron adicionalmente frente a agua destilada durante 24 horas. Se preparó lactoferrina vuelta a unir a hierro como sigue: se dializó lactoferrina apoforma frente a tampón fosfato (pH 7,5) que contenía citrato de hierro y amonio al 0,001%, carbonato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 50 mM durante 24 horas y después se dializó

secuencialmente frente a agua y tampón fosfato (pH 7,5) que contenía cloruro de sodio 50 mM durante 24 horas para eliminar los iones hierro excesivos. Para la medida colorimétrica de iones hierro unidos a la proteína, se usó un kit de medida de hierro en suero "Fe C-Test Wako" (nombre comercial, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón). La capacidad de unión a hierro se calculó como la cantidad de hierro unido por mg de proteína hLF cuantificada por el ensayo Bradford (en el caso de la proteína de fusión de Fc de IgG humana, por mg calculado como hLF usando su peso molecular). Los resultados del experimento en duplicado se muestran en la tabla 4 a continuación

Tabla 4

(Primera ronda)

Resultados medidos para capacidad de unión a hierro

Nombre de la muestra	Cantidad de hierro unida por mg de LF (ng)			Actividad relativa (%)
	Apoforma	Holoforma	Capacidad de unión a hierro (holoforma – apoforma)	
hLF recombinante	154,8	1321,0	1166,1	100
Proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc)	304,8	1362,2	1057,4	90,7
BSA	54,6	167,8	-	-

(Segunda ronda)

Nombre de la muestra	Cantidad de hierro unida por mg de LF (ng)			Actividad relativa (%)
	Apoforma	Holoforma	Capacidad de unión a hierro (holoforma – apoforma)	
hLF recombinante	220,9	1655,5	1434,6	100
Proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc)	207,1	1705,8	1498,7	104,5

Asumiendo que la actividad de unión a hierro de la hLF recombinante derivada de *Aspergillus* se ajustó al 100%, la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) mostró casi el 100% de actividad.

4-2. Estudio de espectros de CD sobre la estabilidad al calor de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida

La hLF recombinante derivada de *Aspergillus* y la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) se analizaron para su estabilidad al calor por espectrometría de dicroísmo circular (CD). La espectrometría de dicroísmo circular (CD) es una técnica para medir una diferencia en la absorbancia entre luz polarizada circularmente hacia la derecha y luz polarizada circularmente hacia la izquierda cuando una sustancia se irradia a cierta longitud de onda. Esta técnica se puede usar para predecir la presencia o ausencia, tipo y contenido de estructura secundaria de proteínas.

Primero, se prepararon suspensiones de hLF recombinante derivada de *Aspergillus* y la proteína de fusión d(hLF/hlgGFc) a 0,1 mg/ml en PBS(-) y se midieron sus espectros de CD a una longitud de onda de 200 nm a 250 nm a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) (usando J-720, JASCO Corporation, Japón).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12. No hubo diferencia significativa en la estructura secundaria entre hLF recombinante (panel A) y la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) (panel C).

A continuación, cada proteína se estudió para su estabilidad al calor. Cuando un espectro de CD se mide mientras se varía la temperatura de una solución de proteína desde baja temperatura a alta temperatura, $[\theta]$ aumenta para alcanzar una meseta a cierta temperatura. Este fenómeno se debe a la desnaturalización inducida por calor de la proteína y el posterior cambio en la estructura secundaria de la proteína. Para seguir la estabilidad al calor, la longitud de onda comúnmente usada para medidas es aproximadamente 225 nm. Se prepararon suspensiones de hLF recombinante derivada de *Aspergillus* y la proteína de fusión d(hLF/hlgGFc) a 0,1 mg/ml en PBS(-) y se midieron sus espectros de CD a una longitud de onda de 225 nm mientras se aumentaba la temperatura desde 30°C a 90°C en incrementos de 1°C (usando J-720, JASCO Corporation, Japón).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13. La hLF recombinante derivada de *Aspergillus* (panel A) mostró un cambio significativo en sus valores de espectro de CD a una temperatura de aproximadamente 67°C. En contraste, y la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) (panel C) no mostró cambio significativo en su espectro de CD a 225 nm incluso cuando se calentó de 30°C a 90°C.

En vista de los resultados anteriores, cuando se compara con la hLF recombinante derivada de *Aspergillus*, se encontró que la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) tenía estabilidad mejorada contra el calor. También se esperaba que la proteína de fusión con bisagra añadida d(hLF/hlgGFc) estructuralmente estable tuviera estabilidad en sangre mejorada *in vivo*.

4-3. Estudio sobre la estabilidad de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida

La proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida purificada con el soporte de intercambio de cationes "MacroCap SP" mostrada en 3-4 se dializó frente a PBS y además se diluyó con PBS para preparar una muestra de concentración 336 µg/ml. Esta muestra se añadió en un volumen de 100 µl a un tubo de 1,5 ml y se hizo reaccionar dejándola reposar a 37°C durante 3 semanas. En las semanas 0, 1, 2 y 3 después de la reacción, se tomaron 3 µl de la muestra y se mezclaron con 1 µl de tampón de carga 4x no reductor, y después se trataron calentando a 95°C durante 5 minutos, seguido por SDS-PAGE al 7,5% para análisis.

Los resultados de la tinción con CBB se muestran en la figura 14. En la figura 14, M representa un marcador, el carril 1 representa hLF (1 µg/carril), y los carriles 2 a 5 representan las muestras después de 0, 1, 2 y 3 semanas, respectivamente. La proteína de fusión era estable durante unas pocas semanas incluso a 37°C. Sin embargo, con el paso del tiempo, la banda de la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida indicada con * se encontró que era más débil, y las bandas indicadas con ** y ***, que parecen ser productos de corte se encontró que eran más fuertes. Esto sería porque la proteína de fusión se cortó por la acción proteasas mezcladas durante el proceso de purificación. Se debe indicar que tal corte no se observó para la proteína de fusión deficiente en bisagra (descrito posteriormente).

4-4. Análisis de sitios de corte en la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida

Para identificar los sitios de corte en la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida, las bandas de corte se analizaron para sus secuencias de aminoácidos N-terminales. En la manera que se ha descrito anteriormente, la proteína de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida (12 µg) se hizo reaccionar dejándola reposar a 37°C durante 3 semanas, y la muestra cortada se sometió después a electroforesis mediante SDS-PAGE al 10%. Después de la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore Corporation) de una manera estándar. La membrana de PVDF teñida con CBB se muestra en la figura 15-A. En la figura 15-A, M representa un marcador, el carril 1 representa hLF (4 µg), y los carriles 2 a 6 representan las muestras después del corte (2 µg/carril cada una). De esta membrana de PVDF, se cortó una banda de aproximadamente 50 kDa (flecha) y se decoloró. La secuencia de aminoácidos N-terminal de esta banda se analizó con procise 491HT (nombre comercial, ABI). Se encontró que la secuencia de aminoácidos resultante era T-H-T-X-P (el cuarto aminoácido era indescodificable). Esta secuencia se analizó adicionalmente y se encontró que corresponde a los aminoácidos 722 a 726 (en la región bisagra) de SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias (figura 15-B).

Ejemplo 2: Preparación de una proteína de fusión ("deficiente en bisagra") formada con lactoferrina humana y una región Fc de IgG humana sin región bisagra, y evaluación de sus actividades biológicas y estabilidad en sangre

1. Construcción de un vector de expresión de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

Se usó el vector pBSIIfAL/Bam preparado anteriormente (figura 1) para construir un vector de expresión para permitir que células animales expresen una proteína de fusión (hLF/mhlgGFc deficiente en bisagra) formada con hLF y hlgGFc sin región bisagra.

Para preparar tal vector de expresión de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc, un fragmento XhoI/BamHI de pBSIIfAL/Bam se clonó en el sitio XhoI/BamHI de pmlgG (figura 3), que es un vector de expresión que lleva la secuencia de ADNc de CH2 y CH3 de la región Fc de IgG humana. Este vector se designó como pmlgG/hLF. La preparación de cada vector de expresión se logró de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Se debe indicar que pmlgG se construyó de modo que la secuencia de ADN genómico correspondiente a las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana localizadas entre BamHI y XbaI del vector de expresión de la proteína de fusión con bisagra añadida anterior pTeulG se sustituyó con una secuencia de ADN correspondiente a las regiones CH2 y CH3 de IgG1 humana.

Para la construcción del vector de expresión de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc, se cortó una región que incluye las secuencias de ADNc de hLF y la región Fc de IgG humana (CH2, CH3) de pmlgG/hLF como un fragmento XhoI/NotI y se clonó en el sitio XhoI/NotI de pOptiVec-MSc preparado anteriormente (figura 4). Este vector se designó como pOptiVEC/hLF-mFc (figura 5). La preparación del vector de expresión se logró de la misma manera que se ha descrito anteriormente. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión hLF/hlgGFc codificada por el vector de expresión de la proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc pOptiVEC/hLF-mFc se muestra en SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias. En SEQ ID NO: 6, los aminoácidos 1 a 711 corresponden a una secuencia de aminoácidos para hLF, los aminoácidos 712 a 713 corresponden a una secuencia de aminoácidos para un espaciador, los aminoácidos 714 a 823 corresponden a una secuencia de aminoácidos para el dominio CH2, y los aminoácidos 824 a 930 corresponden a una secuencia de aminoácidos para el dominio CH3 (figura 17B: basado en las secuencias con los números de registro de Genbank AAB60324.1 y AAA02914.1).

2. Expresión y purificación de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

2-1. Construcción de una línea celular que expresa establemente la proteína de fusión hLF/hlgGFc usando células DG44 como huésped

De la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida, el pOptiVEC/hLF-mFc así preparado se introdujo en células DG44 para establecer una línea celular que expresa establemente la proteína de fusión hLF/hlgGFc. El vector de expresión tratado con PvuI se designó como pOptiVEC/hLF-mFc/PvuI.

De la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida, el pOptiVEC/hLF-mFc/PvuI así preparado se usó para transfectar células DG44, y el cultivo se repitió al tiempo que se aumentaba la concentración de MTX de una manera escalonada.

2-2. Confirmación de la expresión de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

De la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida, la expresión de proteína se analizó por SDS-PAGE al 7,5% y tinción con CBB.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. El peso molecular de la proteína deseada hLF/mhlgGFc es aproximadamente 105 kDa. Cuando la concentración de MTX alcanzó 0,5 μ M, se observó una banda alrededor de aproximadamente 105 kDa indicada con la flecha. Con aumento en la concentración de MTX, la banda era más fuerte, confirmando de esta manera que el nivel de expresión de la proteína se aumentó.

La línea celular establecida en presencia de MTX a una concentración de 4 μ M se designó como DG44-hLF/mhlgGFc.

2-3. Expresión a gran escala de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

De la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida, las células se subcultivaron para realizar la expresión a gran escala de la proteína de fusión. El sobrenadante resultante se almacenó a 4°C.

2-4. Purificación de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

De la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida, la proteína de fusión se purificó del sobrenadante del cultivo obtenido por expresión a gran escala.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. Se encontró que la proteína deseada hLF/mhlgGFc deficiente en bisagra se eluía entre 0,5 M y 0,7 M de NaCl. Este resultado indicaba que la hLF/mhlgGFc deficiente en bisagra unida a "MacroCaP SP" se podría recoger eficazmente en los casos posteriores lavándola con NaCl 0,4 M y eluyéndola con NaCl 1,0 M.

2-5. Concentración de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra mediante precipitación con sulfato de amonio

De la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida, la proteína de fusión se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio y se analizó por SDS-PAGE al 7,5% y tinción con CBB.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11. Se observó precipitación del 60% al 90% de saturación de sulfato de amonio. Además, se midió la concentración de proteína en solución de las fracciones que mostraron precipitación mediante el ensayo de Bradford para calcular la tasa de recuperación en la precipitación con sulfato de amonio (n = 2). Cada concentración de sulfato de amonio y tasa de recuperación (%) obtenida en las mismas se muestran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Concentración saturada de sulfato de amonio	Tasa de recuperación (%)
60%	84,0, 61,7
70%	73,4, 58,8
80%	71,9, 56,8
90%	78,4, 64,2

La tasa de recuperación fue la más alta a sulfato de amonio al 60%. Después de la precipitación con sulfato de amonio, el precipitado se resuspendió en PBS y se dializó frente a PBS para eliminar el sulfato de amonio.

3. Medida de actividades biológicas

3-1. Medida de capacidad de unión a hierro de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

Se midió la capacidad de unión a hierro de lactoferrina de la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida. Los resultados del experimento en duplicado se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

(Primera ronda)

Resultados medidos para capacidad de unión a hierro

Nombre de la muestra	Cantidad de hierro unida por mg de LF (ng)			Actividad relativa (%)
	Apoforma	Holoforma	Capacidad de unión a hierro (holoforma – apoforma)	
hLF recombinante	154,8	1321,0	1166,1	100
Proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc	147,4	1540,0	1393,0	119
BSA	54,6	167,8	-	-

(Segunda ronda)

Nombre de la muestra	Cantidad de hierro unida por mg de LF (ng)			Actividad relativa (%)
	Apoforma	Holoforma	Capacidad de unión a hierro (holoforma – apoforma)	
hLF recombinante	220,9	1655,5	1434,6	100
Proteína de fusión deficiente en bisagra hLF/mhlgGFc	275,0	1790,0	1515,0	106

Asumiendo que la actividad de unión a hierro de la hLF recombinante derivada de *Aspergillus* se ajustó al 100%, la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) mostró el 100% de actividad.

3-2. Estudio de espectros de CD sobre la estabilidad al calor de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

La hLF recombinante derivada de *Aspergillus* y las proteínas de fusión hLF/hlgGFc con bisagra añadida y deficiente en bisagra se analizaron para su estabilidad al calor por espectrometría de CD de la misma que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12. No hubo diferencia significativa entre la hLF recombinante derivada de *Aspergillus* (panel A) y la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra (panel B).

A continuación, cada proteína se estudió para su estabilidad al calor de la misma manera que en el caso de la proteína de fusión con bisagra añadida. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13. La hLF recombinante derivada de *Aspergillus* (panel A) mostró un cambio significativo en sus valores de espectro de CD a una temperatura de aproximadamente 67°C, mientras que la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra (panel B) no mostró cambio significativo en su espectro de CD a 225 nm incluso cuando se calentó de 30°C a 90°C.

En vista de los resultados anteriores, cuando se compara con hLF, se encontró que la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra tenía estabilidad mejorada contra calor y también se esperaba que tuviera estabilidad mejorada en sangre *in vivo*.

3-3. Estudio sobre la estabilidad en sangre de la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra en ratas

Con anestesia con pentobarbital sódico, una cánula para la recogida de sangre se mantuvo en la vena yugular externa de cada una de seis ratas Wistar (macho) de 8 semanas de edad. A las ratas se les administró hLF recombinante derivada de *Aspergillus* (a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal) o la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) (a una dosis de 1 mg/kg de peso corporal calculado como hLF) por inyección en la vena femoral. Antes de la administración y a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos después de la administración, se recogió sangre a través de la cánula mantenida en la vena yugular externa, y la concentración de hLF en plasma se midió por ELISA ("kit de ELISA de Lactoferrina Humana AssayMax", Assaypro). Se debe indicar que se han realizado estudios preliminares para confirmar que el anticoagulante EDTA usado durante la recogida de sangre y plasma no afectan esta medida de ELISA. Además, el kit de ELISA usado está compuesto de anticuerpo anti-lactoferrina humana biotinilado (anticuerpo primario) y estreptavidina marcada con peroxidasa. Por tanto, no hay necesidad de preocupación sobre reacción cruzada entre el anticuerpo secundario y la región Fc de (hLF/mhlgGFc) deficiente en bisagra, que produciría un problema en ensayos de ELISA comúnmente usados que implican el uso de anticuerpo secundario.

Primero, la hLF recombinante derivada de *Aspergillus* y la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc), cuya concentración se midió por el ensayo de Bradford, se usaron para preparar curvas de calibración respectivas. Puesto que se obtuvo linealidad de 0,47 a 7,5 ng/ml para la hLF recombinante derivada de *Aspergillus* y de 0,235 a 30,0 ng/ml para la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc), cada muestra de plasma se diluyó de modo que su valor medido estuviera en este intervalo, y después de midió su concentración de proteína.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16. Antes de la administración, LF no se detectó de sangre en ambos grupos que reciben la hLF recombinante derivada de *Aspergillus* y la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc). En el grupo tratado con la hLF recombinante derivada de *Aspergillus*, LF casi se depuró de la sangre a los 60 minutos después de la administración, mientras que LF todavía se detectó después de 240 minutos en el grupo tratado con la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc).

Se usó el software de análisis estadístico "GraphPad Prism 4" (GraphPad Software) para calcular la semivida en sangre y el área bajo la curva de tiempo (AUC). La semivida de hLF en sangre del grupo tratado con la hLF recombinante derivada de *Aspergillus* fue 12,6 minutos, mientras que la semivida de hLF en sangre del grupo tratado con la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) fue 67,7 minutos, es decir, prolongado aproximadamente 5,4 veces en el grupo tratado con la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc). La AUC de hLF aumentó aproximadamente 7,4 veces en el grupo tratado con la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) en comparación con el grupo tratado con hLF. En vista de los resultados anteriores, cuando se compara con la hLF recombinante derivada de *Aspergillus*, la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) mostró una mejora significativa en estabilidad en sangre.

3-4. Prueba de resistencia a proteasa *in vitro* en la proteína de fusión hLF/hlgGFc deficiente en bisagra

En suero bovino al 75%/PBS, la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) se hizo reaccionar a una concentración de 0,2 µg/µl durante un periodo de tiempo largo a 37°C. Después de 0, 14, 21, 38 y 55 días, se recogieron muestras y se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpo anti-hLF para detectar el tamaño y cantidad de LF residual.

Los resultados indicaron que, durante el periodo de almacenamiento hasta 55 días, LF casi no recibió corte y por tanto mantuvo su peso molecular inicial, y tampoco mostró disminución en la cantidad detectada (figura 18) cuando se comparó con los datos obtenidos a 0 días. Por tanto, la proteína de fusión de la presente invención tiene suficiente resistencia contra corte de proteasa en sangre.

Ejemplo 3: Evaluación de la proteína de fusión ("deficiente en bisagra"), que está formada con lactoferrina humana y región Fc de IgG humana, para la absorción en células de tipo epitelial del intestino delgado humano y resistencia a quimotripsina

1. Evaluación de absorción en células de tipo epitelial del intestino delgado humano (Caco2)

Se sabe que LF es absorbida desde el tracto intestinal y transferida al conducto torácico linfático. A continuación, se usaron células de tipo epitelial del intestino delgado humano (células Caco2) para confirmar si la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) preparada en este estudio se absorbía a través de esta ruta.

hLF y la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGFc) se marcaron cada una con una sonda fluorescente, Alexa Fluor 488. A 1 mg de Alexa Fluor 488, se añadieron 100 µl de DMSO. Posteriormente, cada proteína suplementada con NaHCO₃ 1 M se mezcló con Alexa Fluor 488 a una proporción molar de 1:10 y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, las soluciones se reaccionaron se dializaron frente a PBS(-) 1x durante 24 horas para eliminar Alexa Fluor 488 sin marcar.

Se sembraron células Caco-2 en placas de 12 pocillos a una densidad celular de 5×10^4 células/ml y se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 1 semana (con sustitución de medio cada 2 días). A las células Caco-2, se añadió PBS(-) a 1 ml/pocillo, y se repitió el lavado tres veces para una eliminación completa de los componentes del medio. A continuación, cada proteína marcada con Alexa se añadió a 15 µg/pocillo y se hizo reaccionar durante 1 hora. Después de 1 hora, cada proteína marcada con Alexa se eliminó, y las células se lavaron una vez mediante la adición de PBS(-) frío a 1 ml/pocillo. Después de lavar, se añadió tripsina al 0,25%/EDTA a 250 µl/pocillo y se hizo reaccionar en condiciones de 37°C durante 5 minutos. Después de 5 minutos, todas las células se recogieron en tubos y se centrifugaron a 200 x g durante 2 minutos a 4°C usando una centrifuga. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se eliminaron y se añadió PBS(-) frío a 1 ml/tubo para resuspender ligeramente las células, seguido por centrifugación a 200 x g durante 2 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se eliminaron y se añadió PFA al 4%/PBS(-) a 200 µl/tubo para resuspender ligeramente las células, seguido por reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de 15 minutos, los tubos se centrifugaron a 200 x g durante 2 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se eliminaron y se añadió bisbencimidina 1 µg/ml/PBS(-) a 200 µl/tubo para resuspender ligeramente las células, seguido por reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos (tinción nuclear). Después de 15 minutos, los tubos se centrifugaron a 200 x g durante 2 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se eliminaron y se añadió PBS(-) frío a 200 µl/tubo para

resuspender ligeramente las células. Después de la suspensión, los tubos se centrifugaron a 200 x g durante 2 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se eliminaron y se añadió PBS(-) frío a 200 µl/tubo para resuspender ligeramente las células, seguido por transferir las suspensiones en su totalidad de una placa de cámara de 8 pocillos. A continuación, se observó la absorción de fluorescencia con un microscopio de barrido laser confocal LSM510.

Como resultado, se confirmó que hLF y la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) no se absorbieron en células Caco2 en condiciones de 4°C (Figura 19A), pero se pueden absorber en células Caco2 en condiciones de 37°C (figura 19B). Además, su absorción a 37°C se inhibió en presencia de NaN₃ (figura 19C) y una cantidad excesiva de lactoferrina bovina sin marcar (bLF) (figura 19D), confirmando de esta manera que esta absorción intracelular estaba mediada por receptor y que la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) era absorbida en células a través de la misma ruta de absorción que LF. Es decir, se considera que la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) se absorbe a través de uno o más de los receptores de lactoferrina, el receptor de IgG o el receptor de albúmina.

2. Evaluación de la resistencia a digestión con quimotripsina en la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC)

El tampón usado en este experimento se preparó como se indica en la tabla 7 y se ajustó a pH 7,4.

Tabla 7

Tabla 7. Composición de tampón

Tris-HCl 1 M (pH 8,8)	2,5 ml
NaCl 5 M	1 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O 1M	100 µl
Ajustar hasta	50 ml

hLF y la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) se resuspendieron a 1 mg/ml en este tampón.

[Prueba de resistencia a enzima digestiva]

Se mezclaron 150 µl de hLF o proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) 1 mg/ml con 120 µl del tampón y se dejaron reposar a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se añadió una solución de quimotripsina 16,7 µg/ml (30 µl) a las muestras de reacción y se hizo reaccionar dejándolas reposar a 37°C. Se recogieron muestras de reacción (36 µl cada una) a lo largo del tiempo y cada una se añadió a 12 µl de tampón de carga preparado por adelantado (Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS al 4%, glicerol al 20%, una cantidad vestigial de BPB) para parar la reacción de digestión. A continuación, las soluciones de reacción se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE al 10% (cada solución se usó a 15 µl/carril), seguido por tinción con CBB.

La figura 20 muestra los resultados de electroforesis obtenidos para, desde la izquierda, un marcador de peso molecular, muestras de hLF dejadas reposar a 37°C en ausencia de quimotripsina, muestras de hLF dejadas reposar a 37°C en presencia de quimotripsina, muestras de proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) dejadas reposar a 37°C en ausencia de quimotripsina, y muestras de proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) dejadas reposar a 37°C en presencia de quimotripsina.

La densidad de cada banda se analizó por ImageJ. Los resultados se representaron en un gráfico, asumiendo que la densidad media de la banda en ausencia de quimotripsina se ajustó al 100% (figura 21). La proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) casi no se cortó, mientras que hLF que sirve como control se cortó en 30 segundos, indicando de esta manera que la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) era resistente a digestión con quimotripsina.

Además, hLF y la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC), cada una disuelta en el tampón indicado en la tabla 7, se analizaron por cromatografía en columna de gel, que indica que la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) estaba presente como un homodímero (figura 22).

El panel B en la figura 22 es un gráfico que muestra la correlación entre el tiempo de elución y el peso molecular de la proteína. En el cromatograma (figura 22, panel A), la curva azul ("hLF/dhlgGfC") representa los resultados de la proteína de fusión hLF/hlgGfC con bisagra añadida que contiene la región para la formación de dímeros (es decir, la región bisagra). Por otra parte, la curva verde ("hLF/mhlgGfC") representa los resultados de la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC). La filtración en gel de hLF/mhlgGfC y hLF/dhlgGfC indicaba que casi no había diferencia en su tiempo de elución. Esto sugería que la proteína de fusión deficiente en bisagra (hLF/mhlgGfC) formaría un dímero en solución.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona una proteína de fusión de lactoferrina como se define mediante las reivindicaciones y que tiene propiedades mejoradas, usos de la misma y un método para la preparación de la misma.

5 **Lista de secuencias**

<110> NRL PHARMA INC.

<120> Proteína de fusión de lactoferrina y método para producir la misma

10 <130> PCT13-0023

<150> JP 2012-098085

<151> 23-04-2012

15 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador S_LFex_XhoI_ATG

<400> 1

ctcgagatga aacttgcttt cctcgtc

27

30 <210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> cebador AS_LFex_TAA_XbaI

<400> 2

tctagattac ttccctgagga attcac

26

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

50 <400> 3

aattcctcag gaaggatcct

20

<210> 4

<211> 20

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

60 <400> 4

ctagaggatc cttcctgagg

20

ES 2 671 631 T3

<210> 5
 <211> 946
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> HLF-hFc (Bisagra-CH2-CH3)

<400> 5

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu

10

1

5

10

15

ES 2 671 631 T3

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
20 25 30

Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
35 40 45

Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
50 55 60

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

Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
85 90 95

Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
100 105 110

Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
115 120 125

Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
130 135 140

Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
145 150 155 160

Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser

ES 2 671 631 T3

165	170	175
Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu		
180	185	190
Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro		
195	200	205
Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly		
210	215	220
Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp		
225	230	235
Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg		
245	250	255
Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser		
260	265	270
His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp		
275	280	285
Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro		
290	295	300
Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe		
305	310	315
		320

ES 2 671 631 T3

Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser
325 330 335

Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg
340 345 350

Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys
355 360 365

Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu
370 375 380

Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys
385 390 395 400

Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly
405 410 415

Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala
420 425 430

Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val
435 440 445

Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser
450 455 460

Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His

ES 2 671 631 T3

465 470 475 480

Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu
485 490 495

Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser
500 505 510

Cys Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile
515 520 525

Gly Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg
530 535 540

Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asn Ala Gly
545 550 555 560

Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly
565 570 575

Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asp Leu Lys Leu Ala Asp Phe Ala
580 585 590

Leu Leu Cys Leu Asp Gly Lys Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Arg Ser
595 600 605

Cys His Leu Ala Met Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Met Asp
610 615 620

ES 2 671 631 T3

Lys Val Glu Arg Leu Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Lys Phe
625 630 635 640

Gly Arg Asn Gly Ser Asp Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Gln Ser
645 650 655

Glu Thr Lys Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Arg
660 665 670

Leu His Gly Lys Thr Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln Tyr Val
675 680 685

Ala Gly Ile Thr Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu
690 695 700

Ala Cys Glu Phe Leu Arg Lys Asp Pro Glu Glu Pro Lys Ser Cys Asp
705 710 715 720

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
725 730 735

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
740 745 750

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
755 760 765

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

ES 2 671 631 T3

770	775	780	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
785	790	795	800
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	805	810	815
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	820	825	830
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	835	840	845
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	850	855	860
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	865	870	875
			880
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	885	890	895
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	900	905	910
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	915	920	925

ES 2 671 631 T3

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 930 935 940

Gly Lys
 945

5 <210> 6
 <211> 930
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> HLF-hFc (CH2-CH3)

<400> 6
 Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
 20 25 30

Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
 35 40 45

Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
 50 55 60

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

ES 2 671 631 T3

Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
85 90 95

Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
100 105 110

Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
115 120 125

Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly
130 135 140

Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
145 150 155 160

Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser
165 170 175

Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu
180 185 190

Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro
195 200 205

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

Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp

ES 2 671 631 T3

225	230	235	240
Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg			
	245	250	255
Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser			
	260	265	270
His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp			
	275	280	285
Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro			
	290	295	300
Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe			
305	310	315	320
Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser			
	325	330	335
Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg			
	340	345	350
Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys			
	355	360	365
Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu			
370	375	380	

ES 2 671 631 T3

Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys
385 390 395 400

Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly
405 410 415

Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala
420 425 430

Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val
435 440 445

Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser
450 455 460

Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His
465 470 475 480

Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu
485 490 495

Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser
500 505 510

Cys Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile
515 520 525

Gly Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg

ES 2 671 631 T3

530

535

540

Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asn Ala Gly
545 550 555 560

Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly
565 570 575

Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asp Leu Lys Leu Ala Asp Phe Ala
580 585 590

Leu Leu Cys Leu Asp Gly Lys Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Arg Ser
595 600 605

Cys His Leu Ala Met Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Met Asp
610 615 620

Lys Val Glu Arg Leu Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Lys Phe
625 630 635 640

Gly Arg Asn Gly Ser Asp Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Gln Ser
645 650 655

Glu Thr Lys Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Arg
660 665 670

Leu His Gly Lys Thr Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Pro Gln Tyr Val
675 680 685

ES 2 671 631 T3

Ala Gly Ile Thr Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu
690 695 700

Ala Cys Glu Phe Leu Arg Lys Asp Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
705 710 715 720

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
725 730 735

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
740 745 750

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
755 760 765

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
770 775 780

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
785 790 795 800

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
805 810 815

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
820 825 830

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

ES 2 671 631 T3

835

840

845

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
850 855 860

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
865 870 875 880

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
885 890 895

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
900 905 910

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
915 920 925

Gly Lys
930

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión formada con una proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn y lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina, que está representada por:

(LF-s-Y)_n o (Y-s-LF)_n

en donde

LF representa lactoferrina o un fragmento o péptido biológicamente activo de lactoferrina, Y representa la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn, s representa cualquier secuencia de aminoácidos de 0 a 10 residuos, y n representa un número entero de 1 a 10, en donde Y está libre de región bisagra.

2. La proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde la proteína o péptido que comprende una región de unión a FcRn comprende cualquiera de IgG, la cadena pesada de IgG, la región Fc de la cadena pesada de IgG, los dominios CH2 y CH3 de la región Fc, el dominio CH2 de la región Fc, albúmina o la región de unión a FcRn de albúmina.

3. La proteína de fusión según la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína de fusión es un monómero o dímero (n = 1 o 2).

4. La proteína de fusión según la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína de fusión es un monómero.

5. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína de fusión retiene el 50% o más de la capacidad de quelar hierro de lactoferrina natural o recombinante génica.

6. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína de fusión se absorbe a través de al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en el receptor de lactoferrina, el receptor de IgG y el receptor de albúmina.

7. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la proteína de fusión tiene resistencia a quimotripsina mejorada cuando se compara con lactoferrina natural o recombinante génica.

8. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.

10. Una célula huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 9.

11. Un animal no humano genéticamente modificado que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.

12. Una planta genéticamente modificada que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 8.

13. Un agente terapéutico para enfermedades mejoradas por lactoferrina, que comprende la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

14. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un soporte.

15. Un método para preparar la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un gen que codifica la proteína de fusión para expresar la proteína de fusión, y recoger la proteína de fusión de la célula huésped o el medio de la misma.

Figura 1

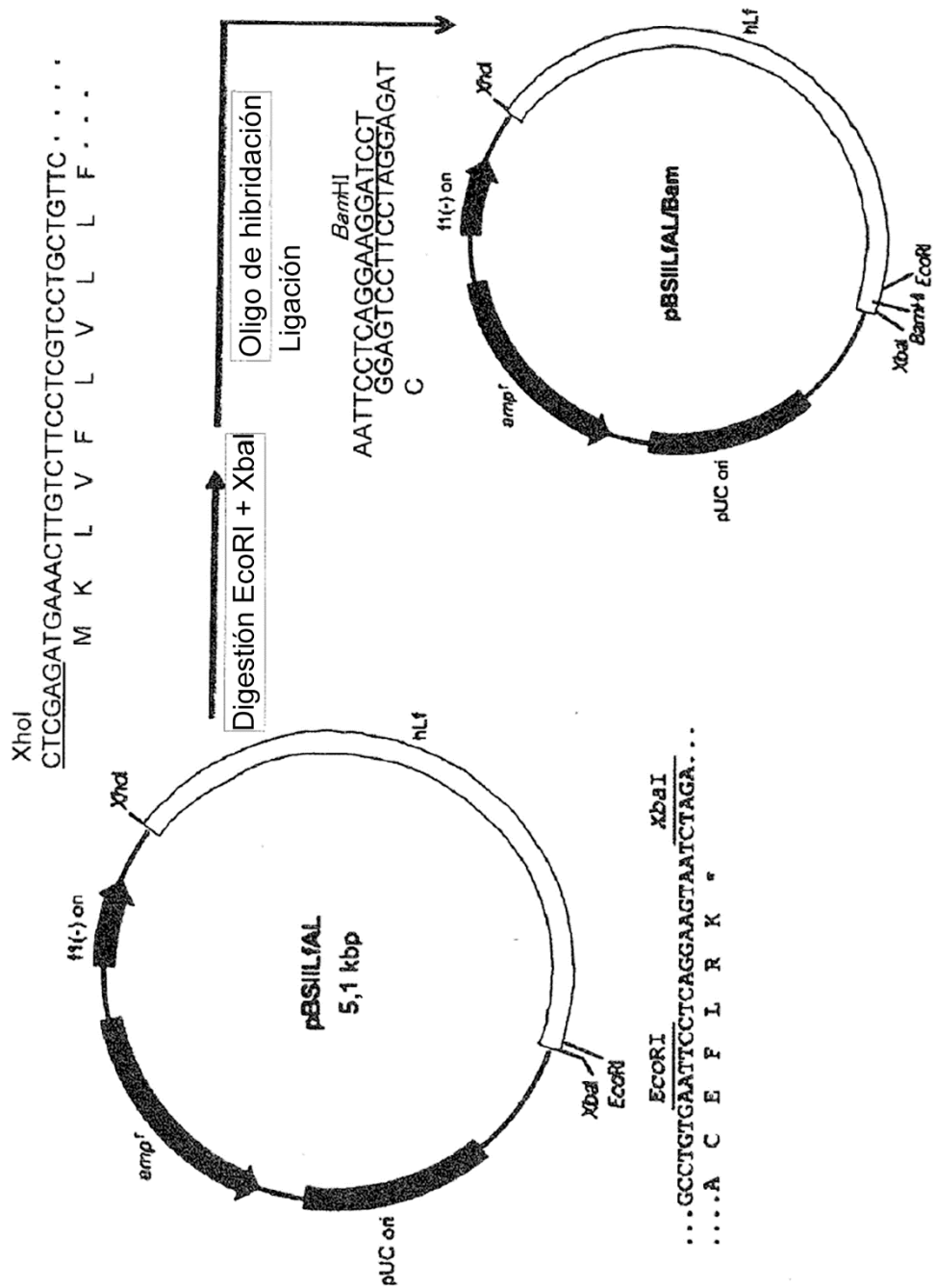


Figura 2

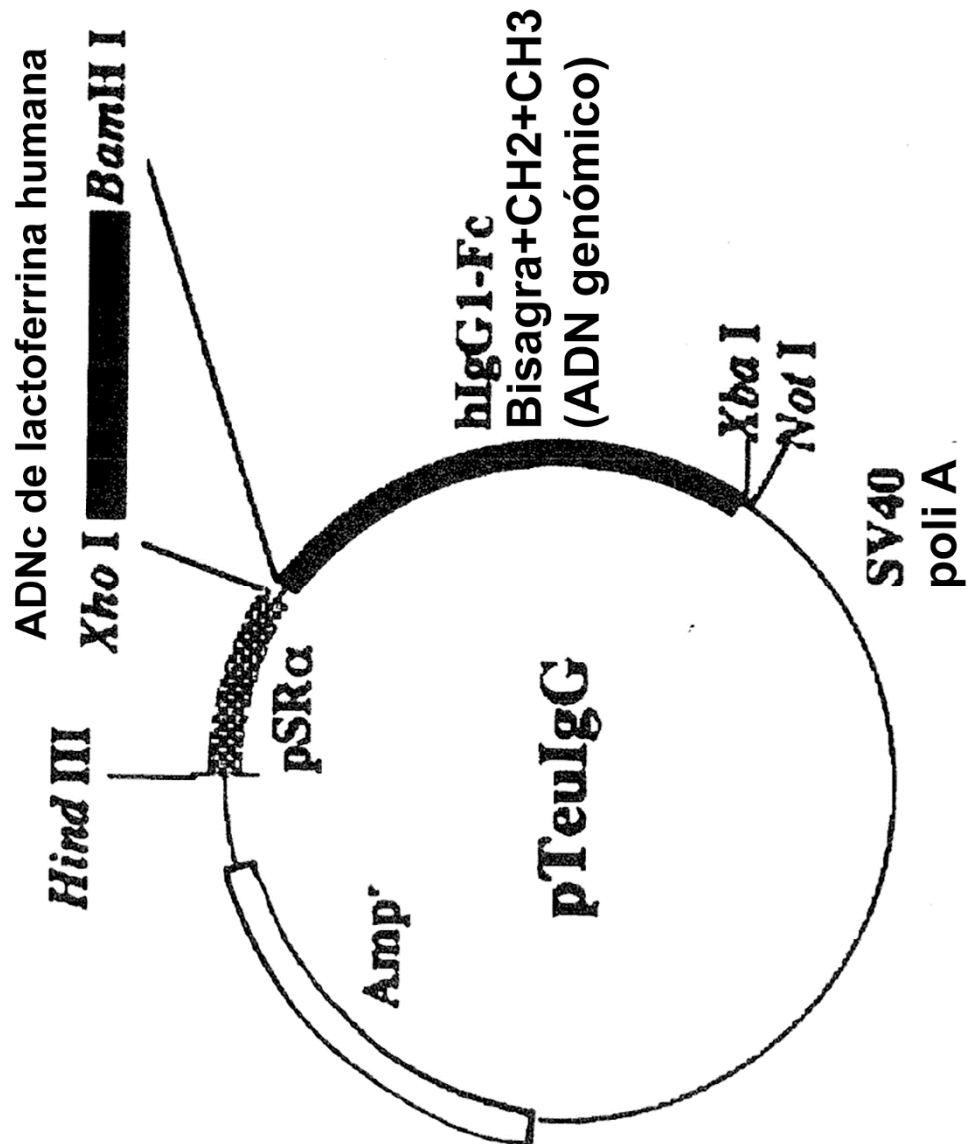


Figura 3

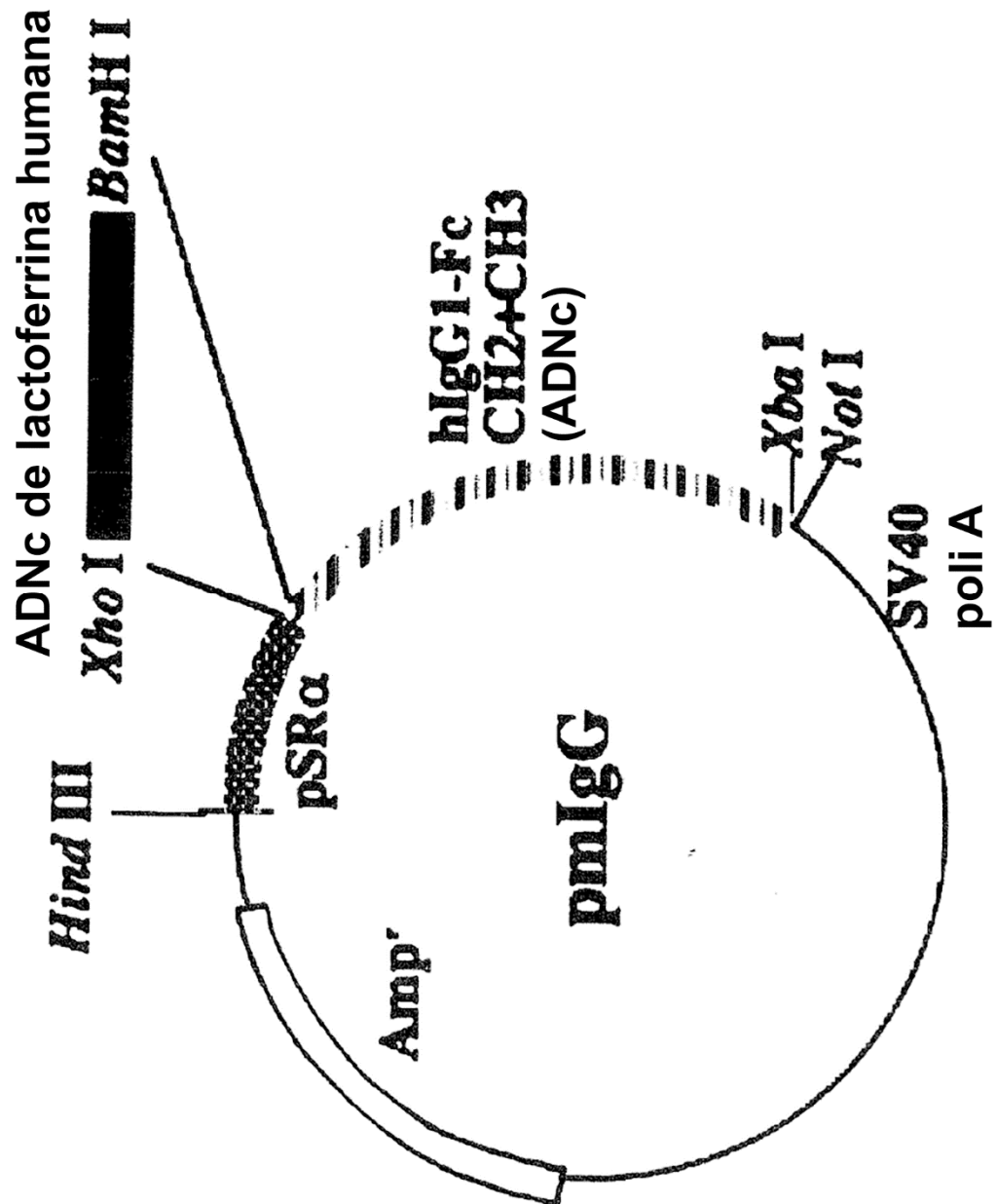


Figura 4

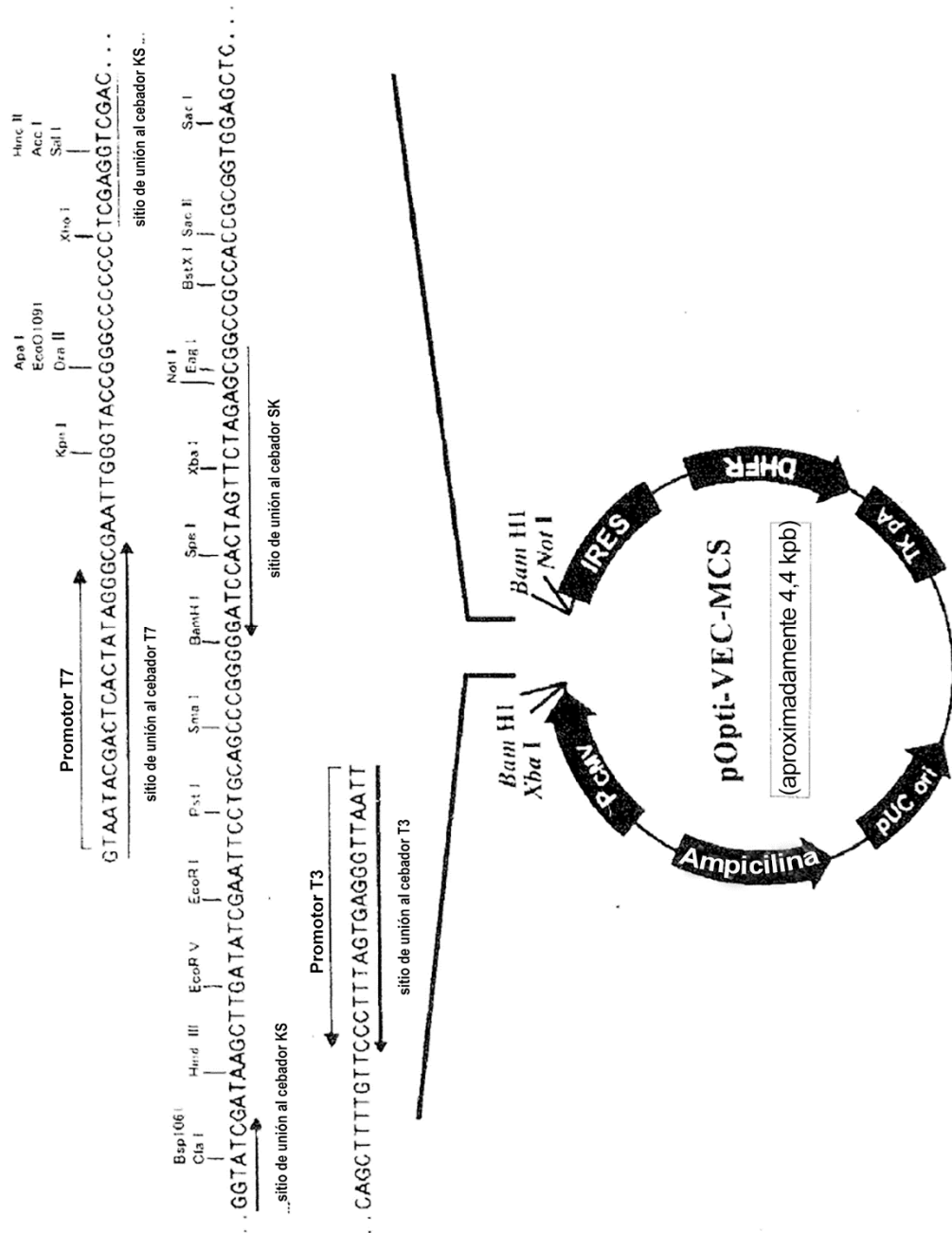


Figura 5

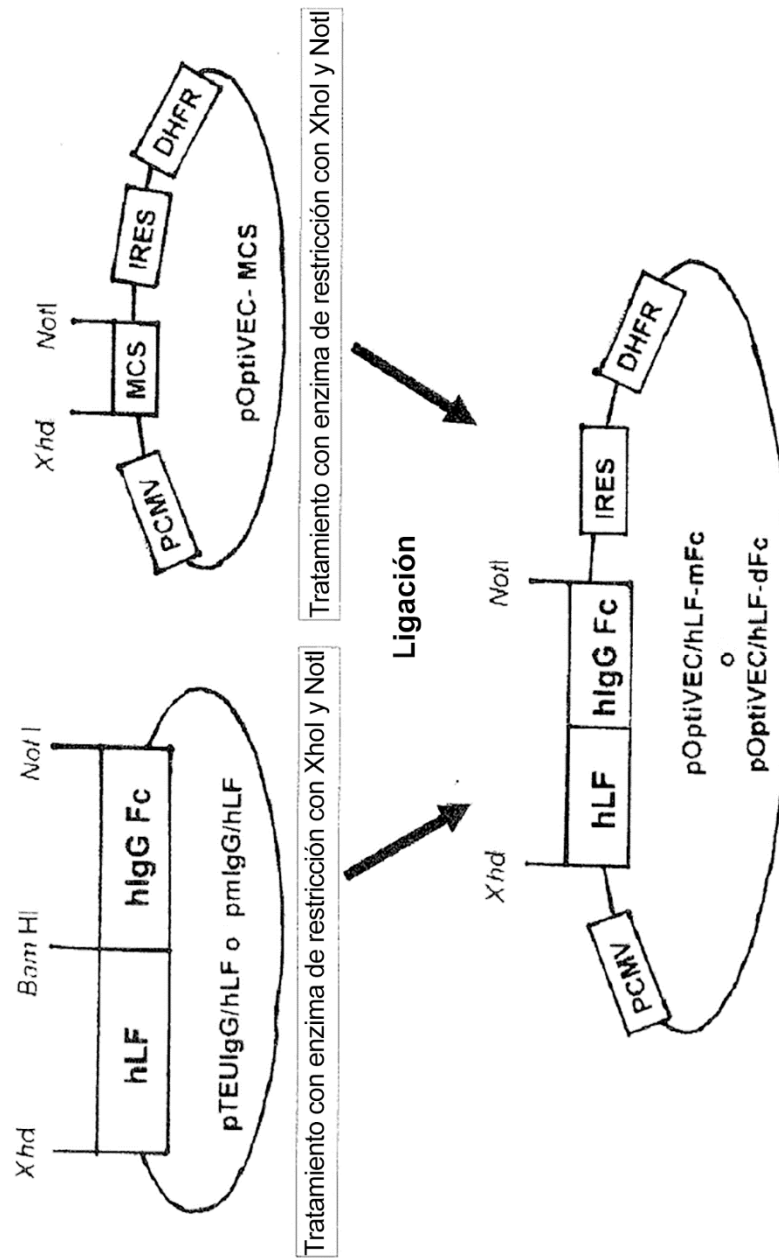


Figura 6

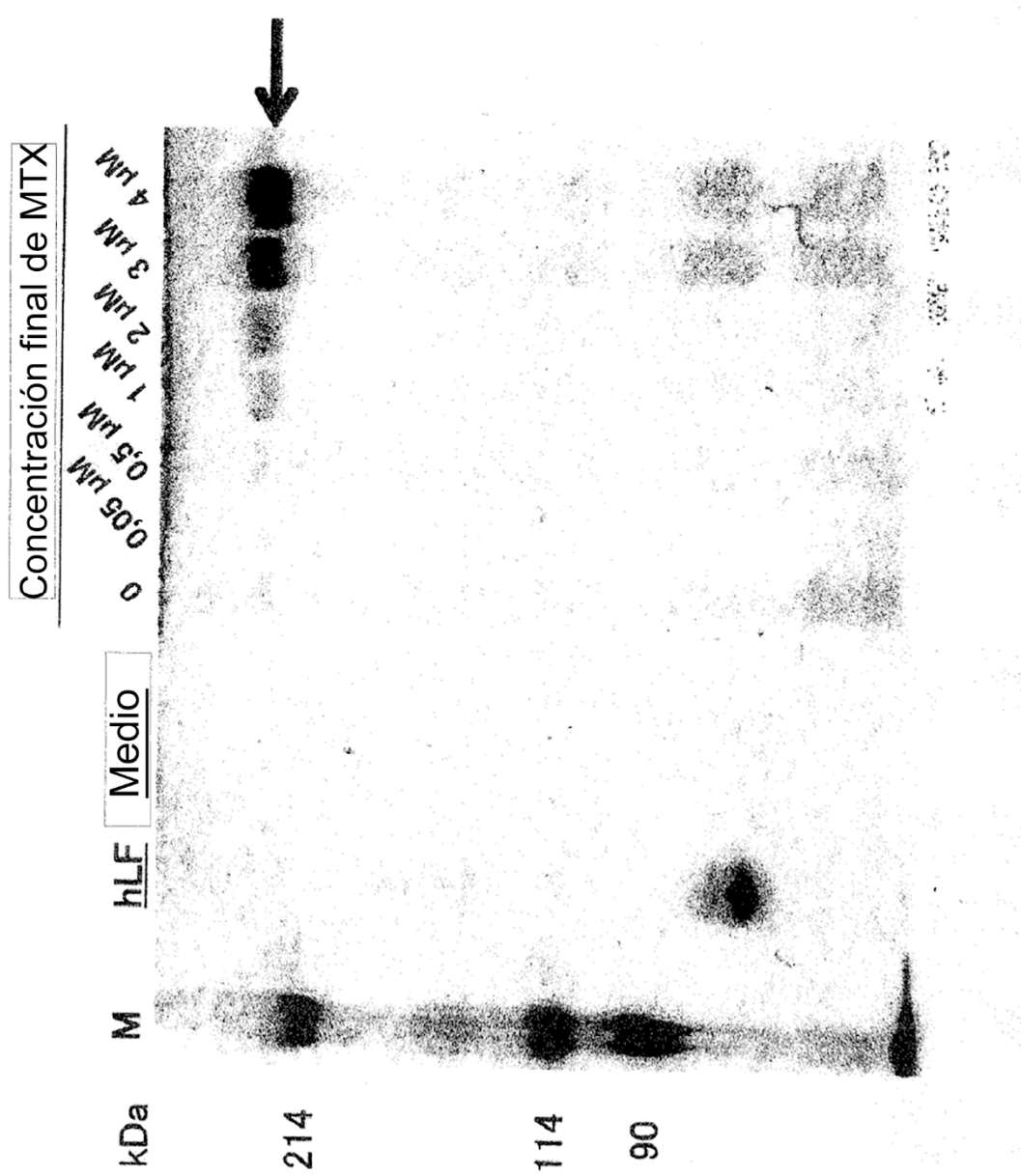


Figura 7

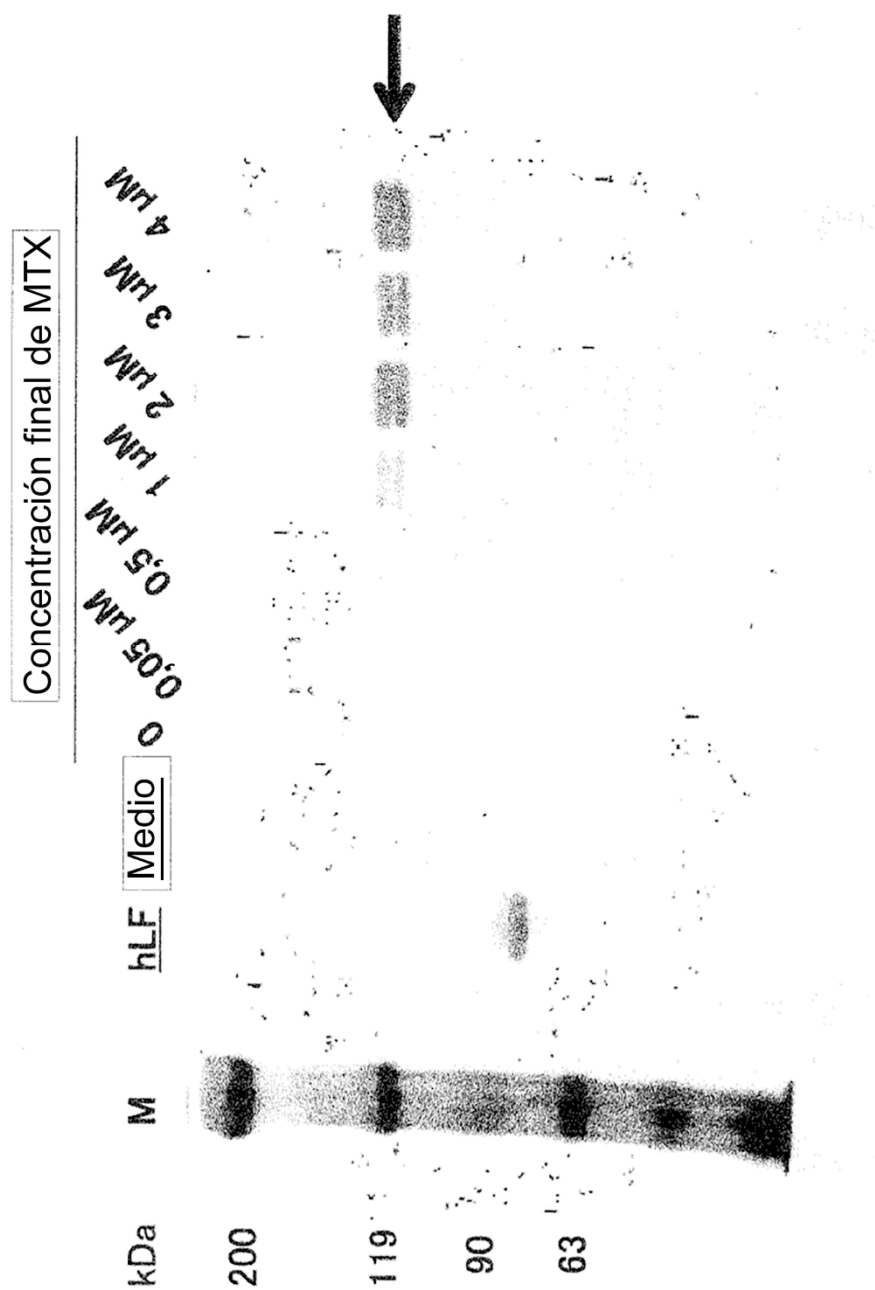


Figura 8

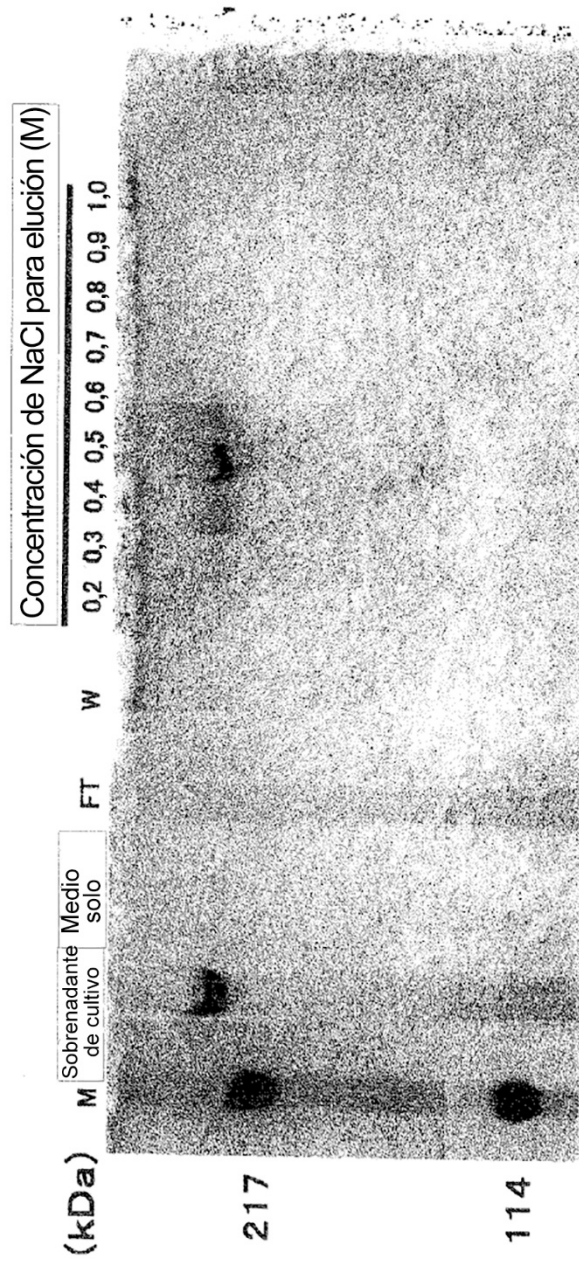


Figura 9

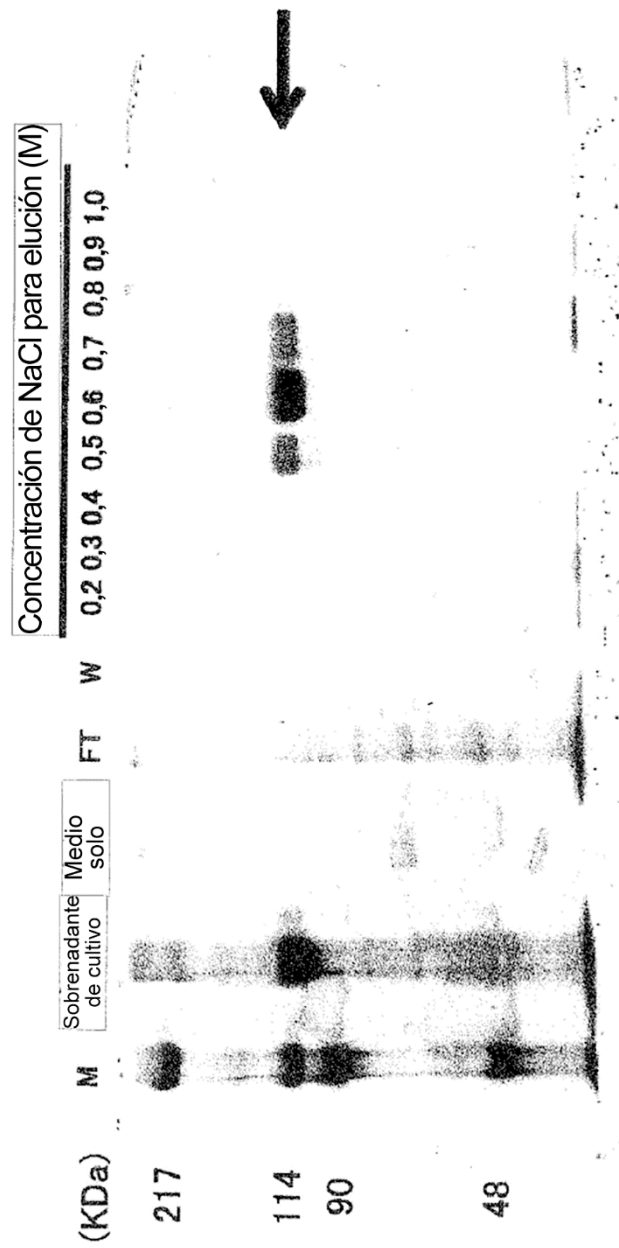


Figura 10

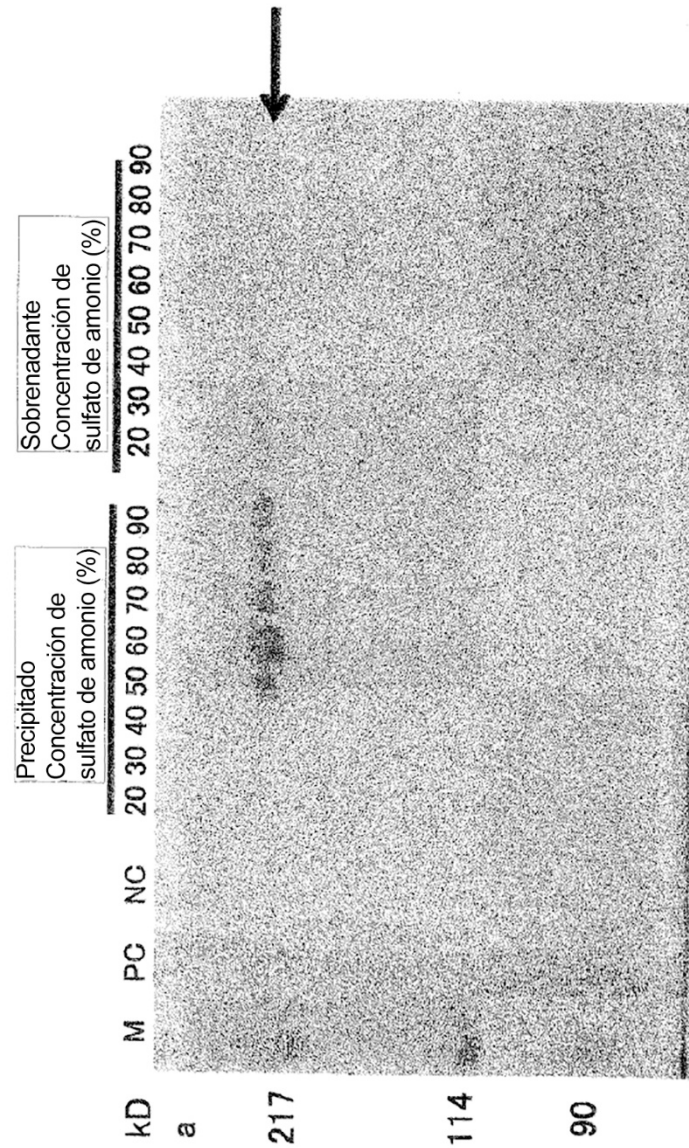


Figura 11

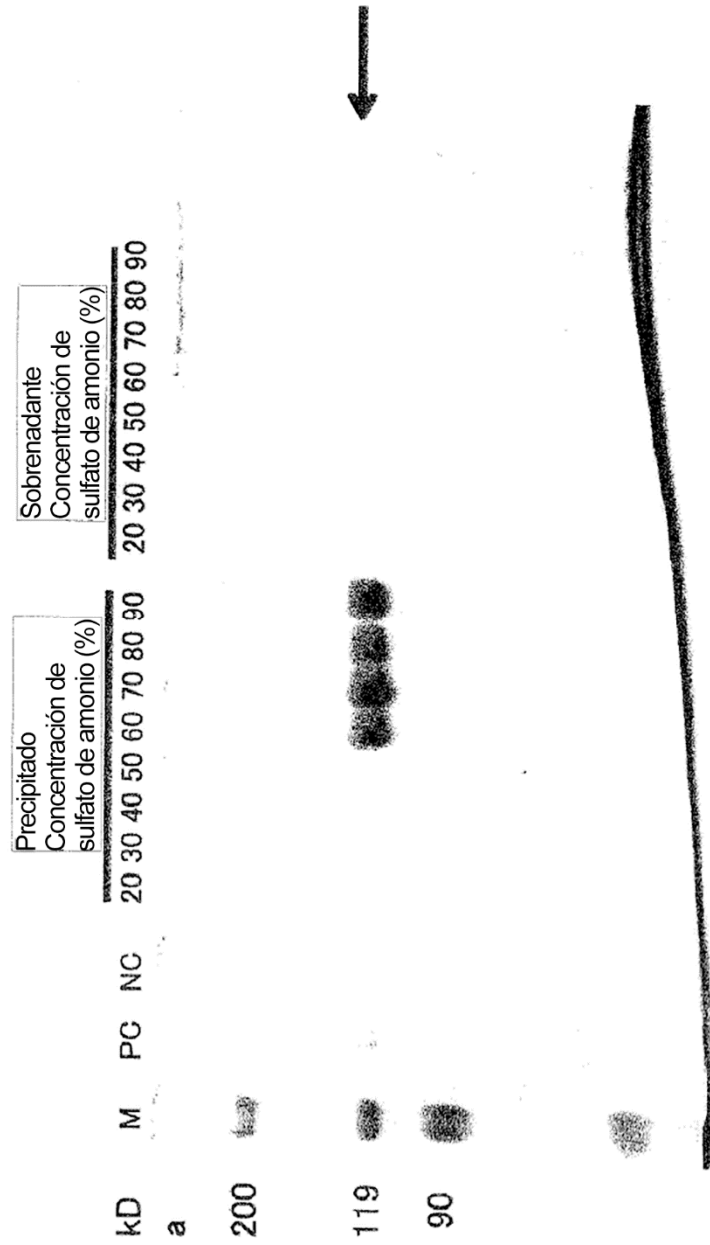


Figura 12A

A

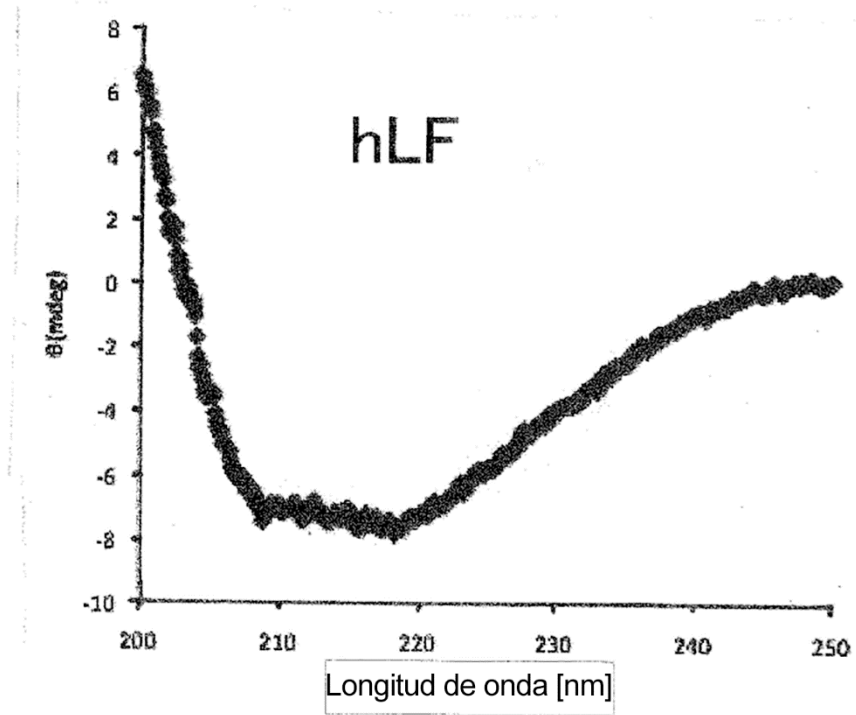


Figura 12B

B

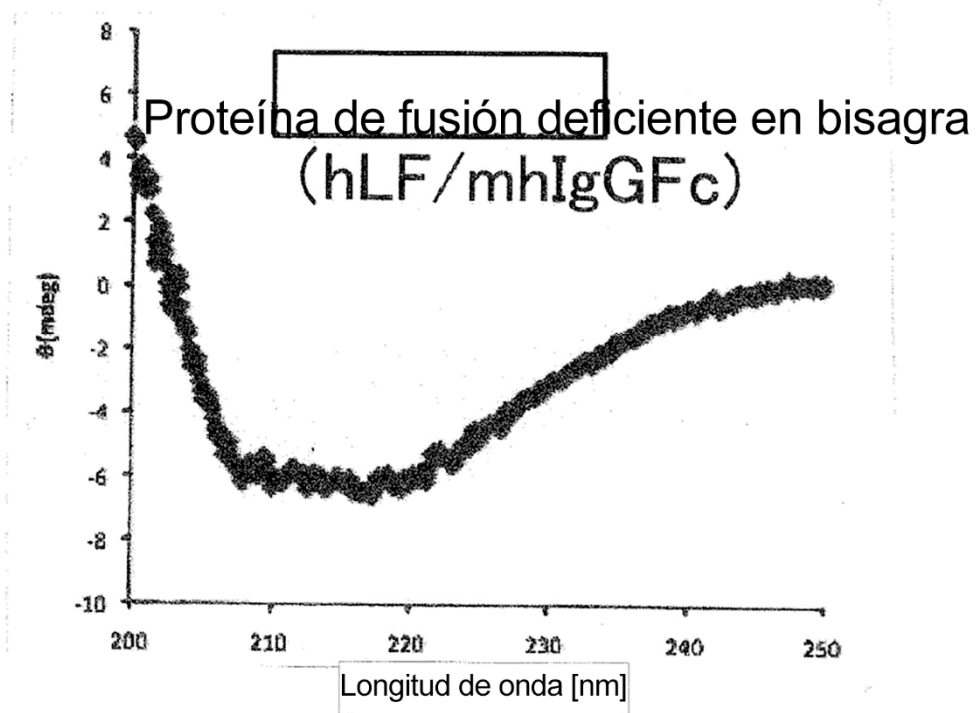


Figura 12C

C

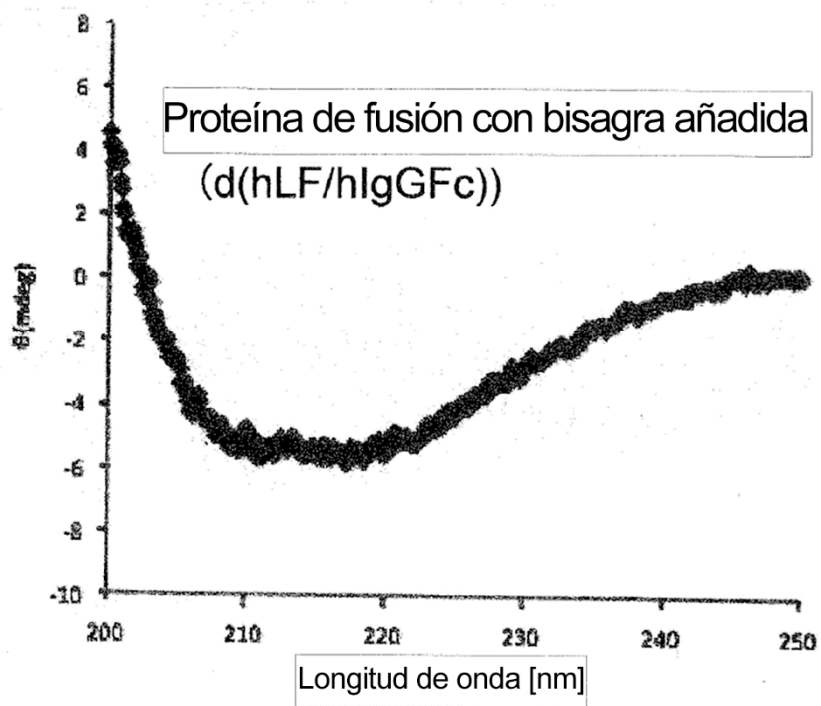


Figura 13A

A

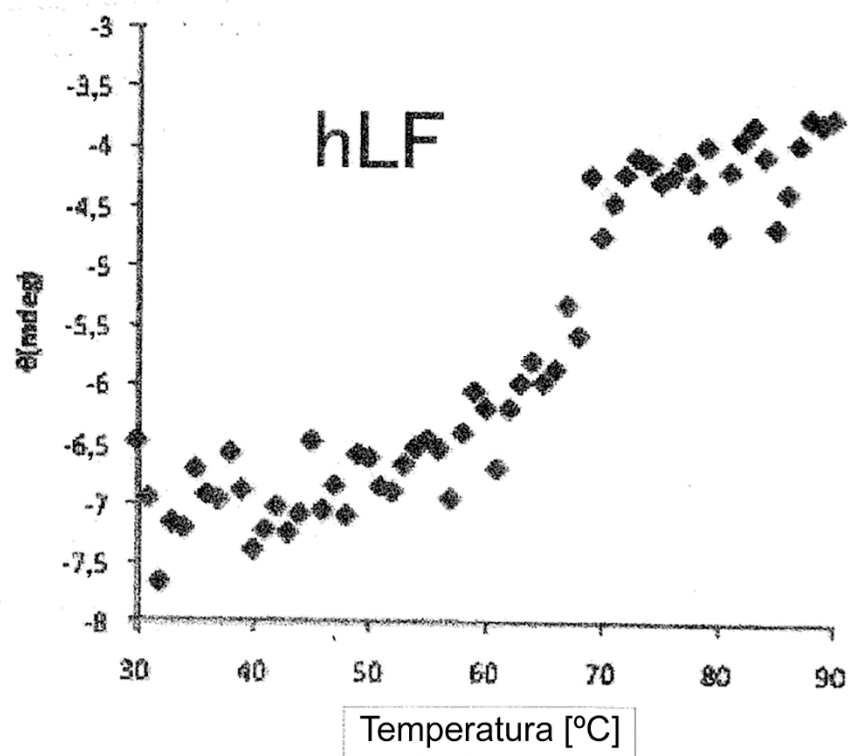


Figura 13B

B

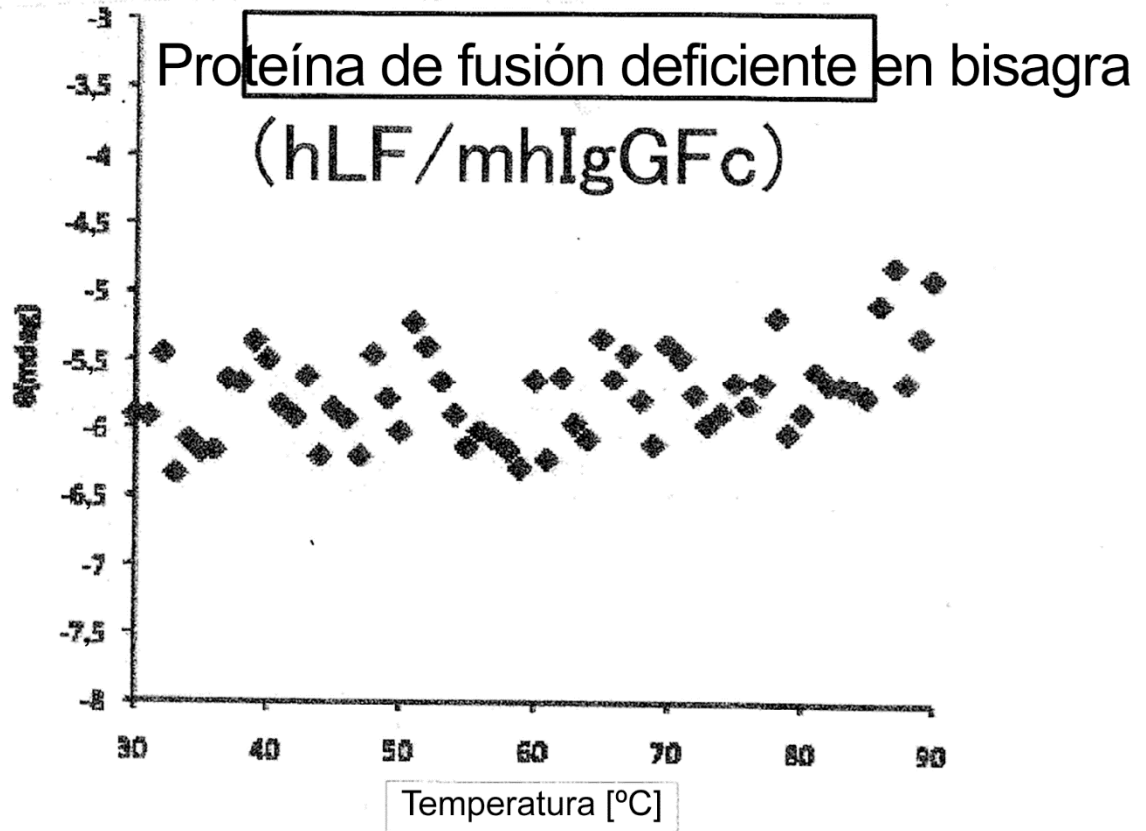


Figura 13C

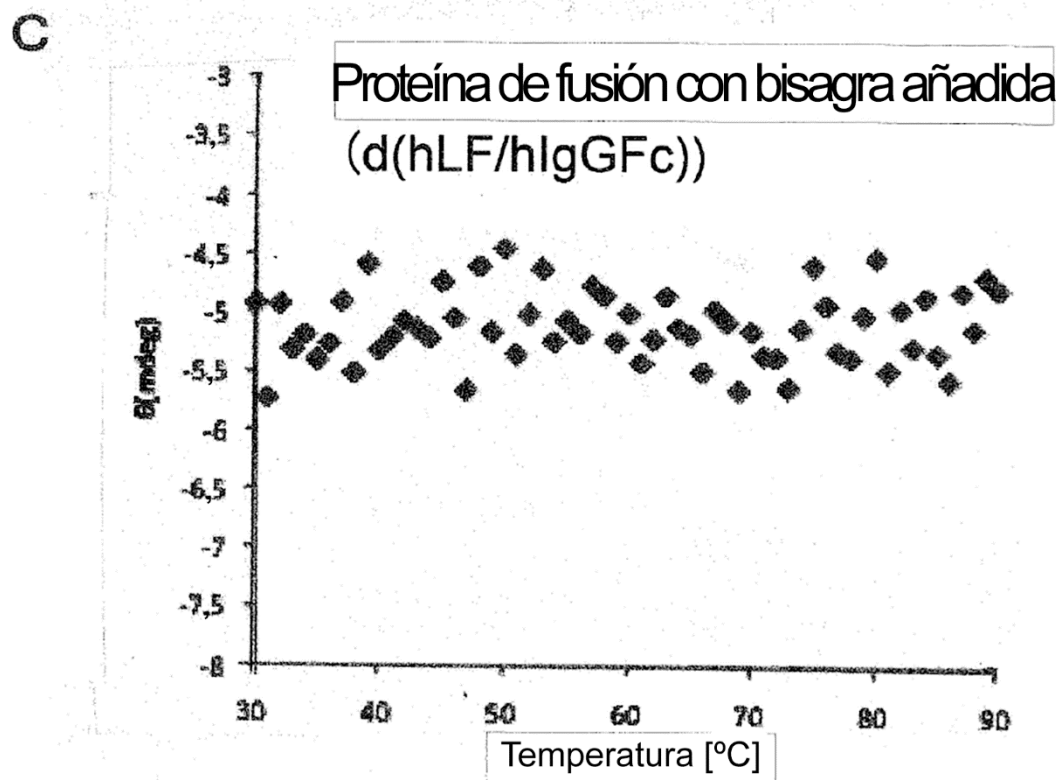


Figura 14

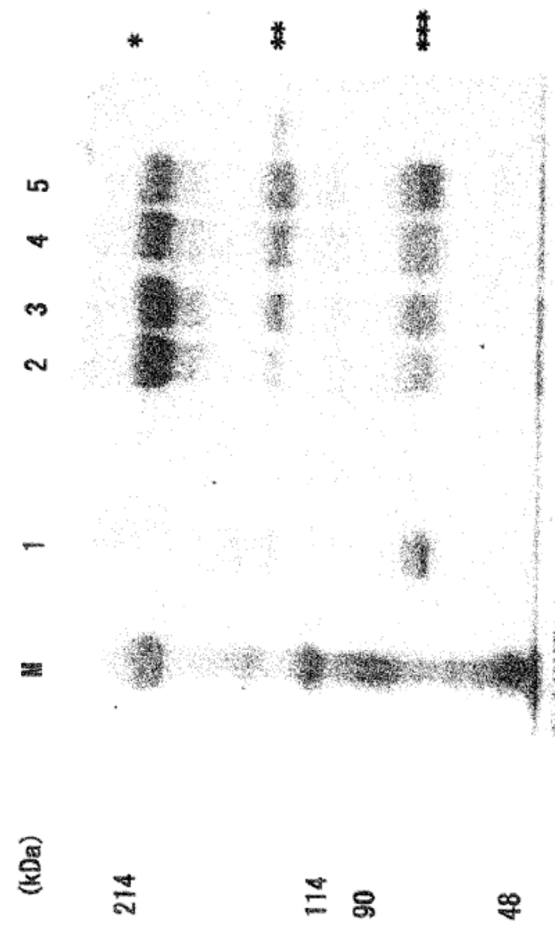


Figura 15A

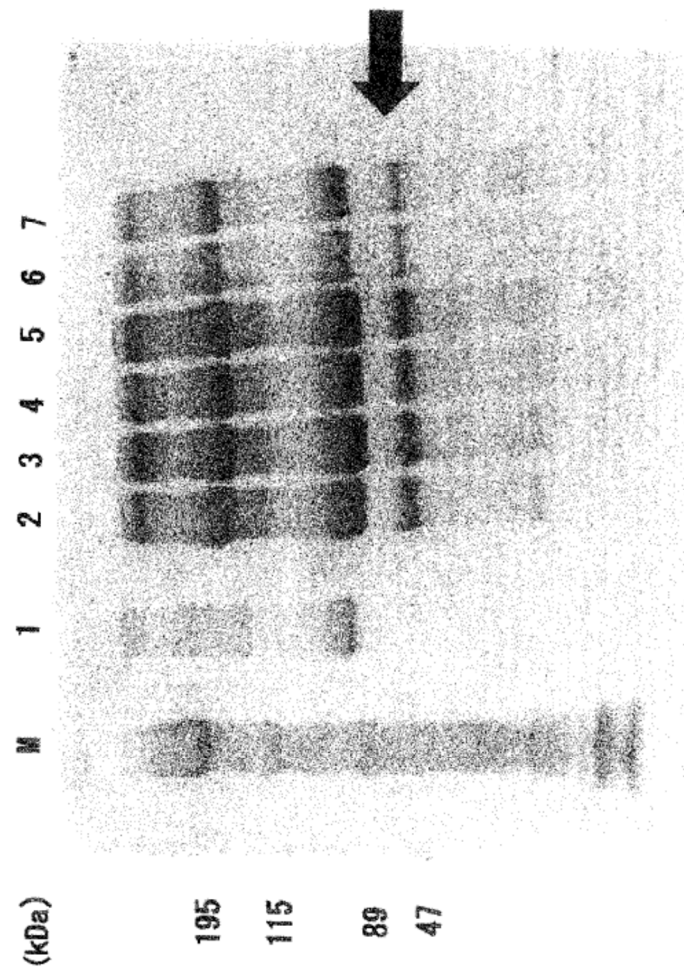


Figura 15B

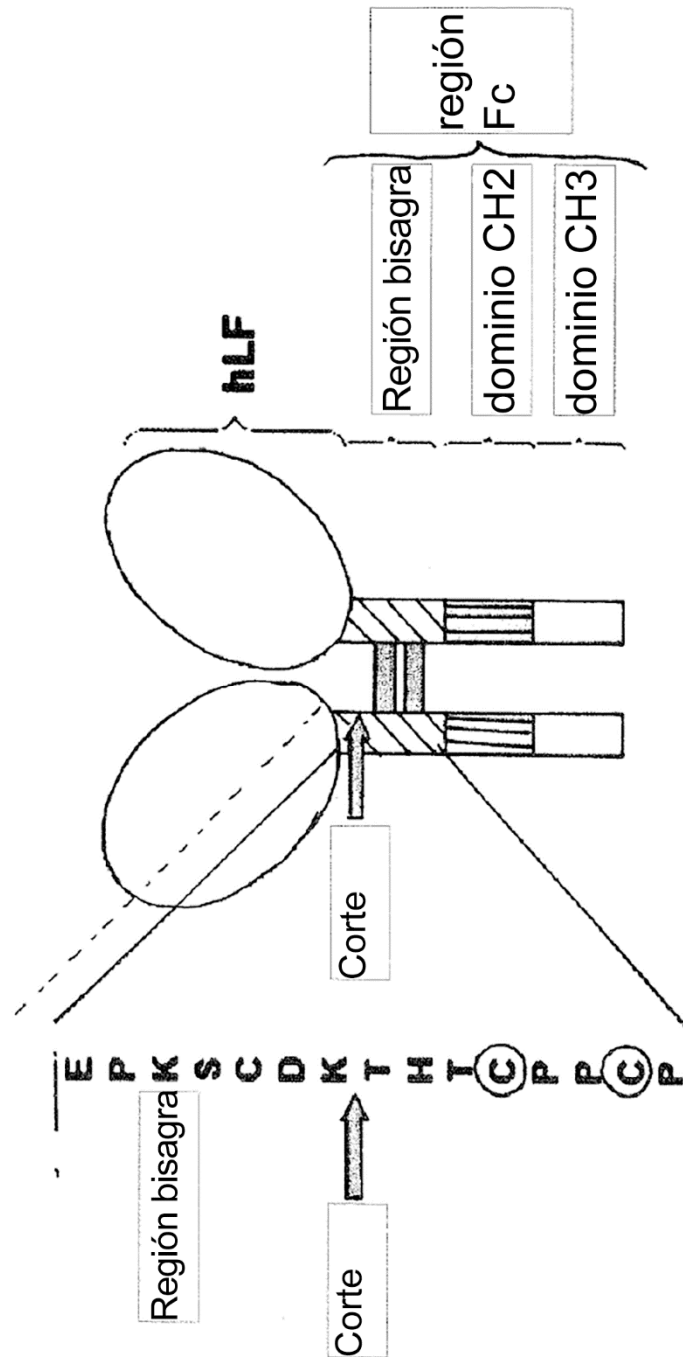


Figura 16

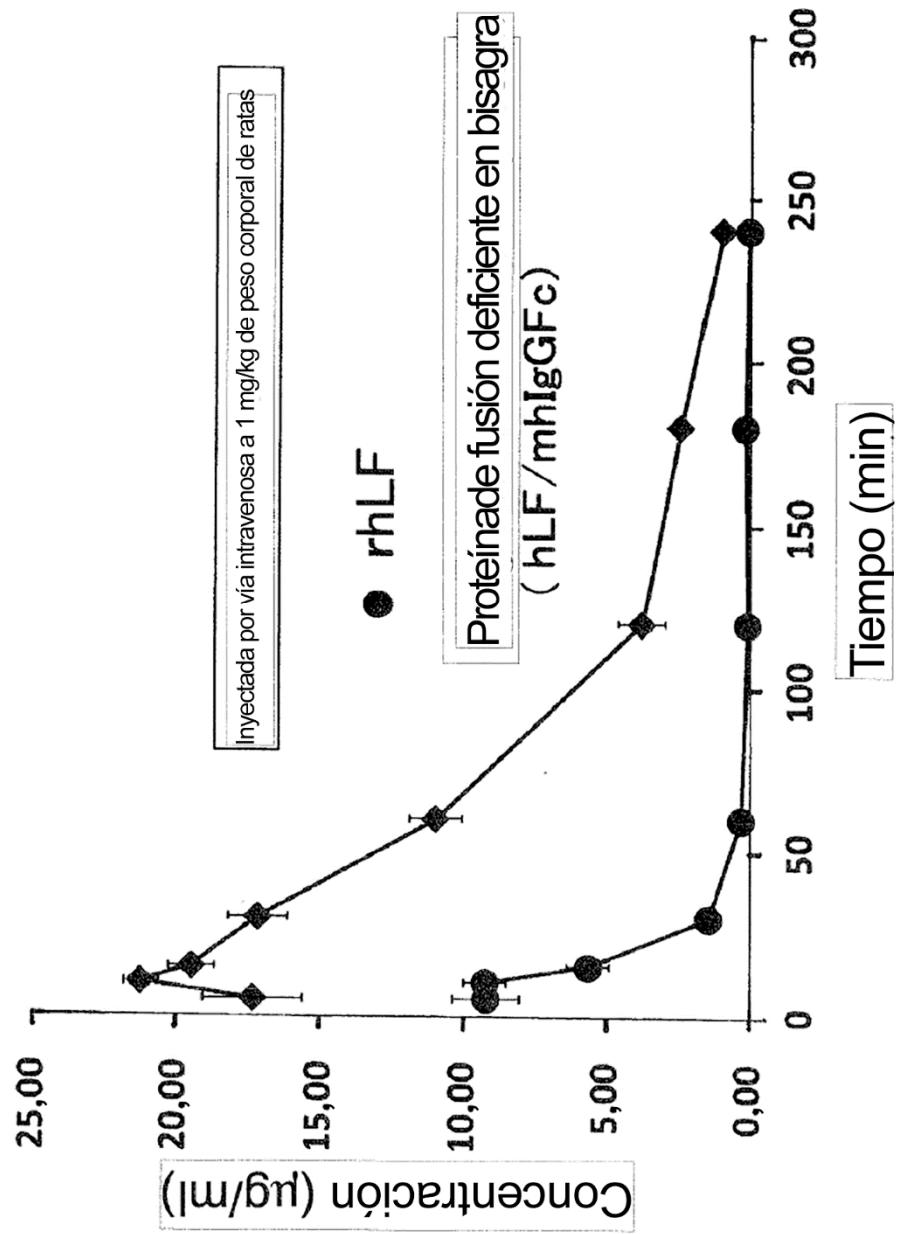


Figura 17A

MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRK
 VRGPPVSCIKRDSPIQCIQAIAENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAA
 EVYGTERQPRTHYYAVAVVKKGGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVP
 IGTLRPFLNWTGPPEPIEA A VARFFSASCVP GADKGQFPNLCRLCAGTGE
 NKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSDEAERDEYE
 LLCPDNTRKPVDFKDKCHLARVP SHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQE
 KFGKDKSPKFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFT
 AIQNLRKSEEEVAARRARVVWCAVGEQELRKCQWWSGLSEGSVTCSSAS
 TTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVYTAGKCGLVPVLAENYKSQQSSDPD
 PNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWN SVKGKKSCHTAVDRTAGWNIPM
 GLLFNQTGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPSN
 ERYYG YTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLAD
 FALLCLDGKRKPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQA
 KFGRNGSDCPDKFCLFQSETKNLLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPQ
 YVAGITNLKKCSTSPLEACEFLRKDPEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK

Figura 17B

MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRK
 VRGPPVSCIKRDSPIQCIQAIAENRADAVTLDGGFIYEAGLAPYKLRPVAA
 EVYGTERQPRTHYYAVAVVKKGGSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVP
 IGTLRPFLNWTGPPEPIEA A VARFFSASCVP GADKGQFPNLCRLCAGTGE
 NKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSDEAERDEYE
 LLCPDNTRKPVDKFKDCHLARVP SHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQE
 KFGKDKSPKFQLFGSPSGQKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFT
 AIQNLRKSEEEVAARRARVWCAVGEQELRKCNQWSGLSEGSVTCSSAS
 TTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVYTAGKCGLPVLAENYKSQQSSDPD
 PNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCHTAVDRTAGWNIPM
 GLLFNQTGSCKFDEYFSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVPSN
 ERYYG YTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNNEAWAKDLKLAD
 FALLCLDGKRKPVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQA
 KFGRNGSDCPDKFCLFQSETKNLLFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPQ
 YVAGITNLKKCSTSPLEACEFLRKDPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 18

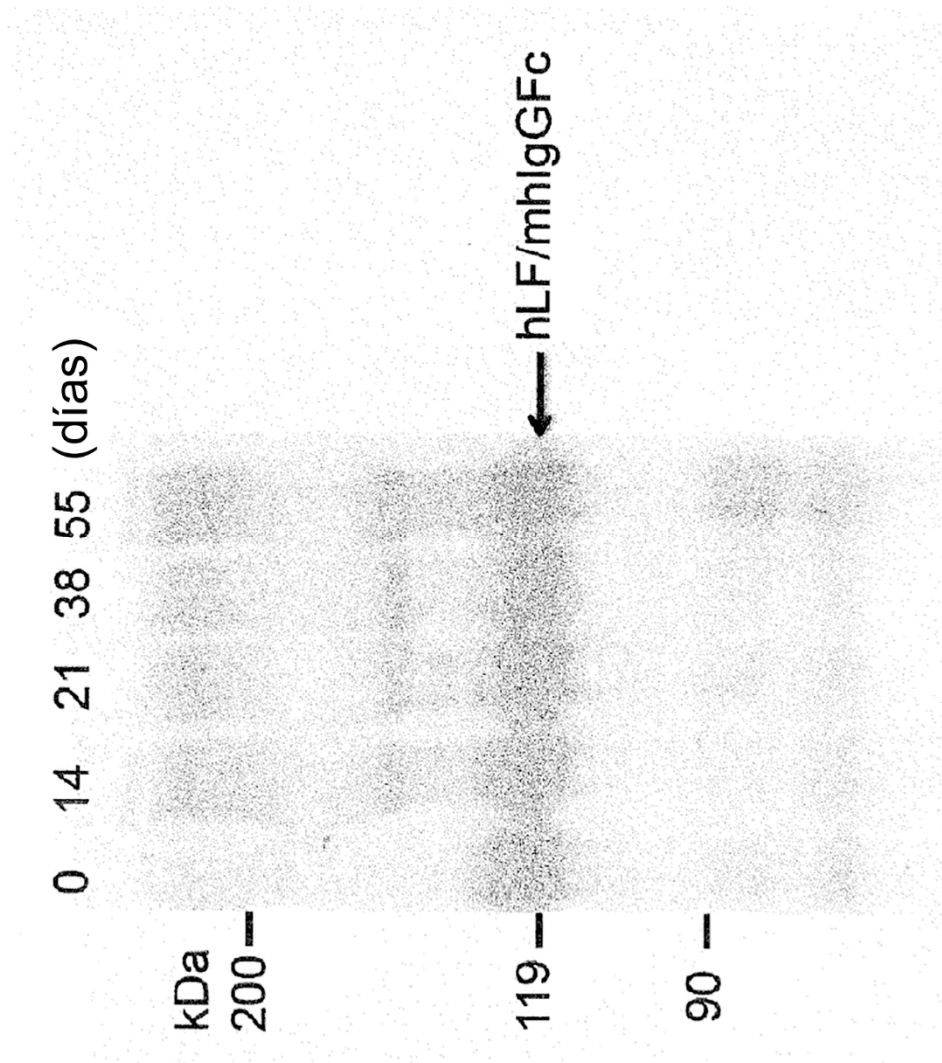


Figura 19

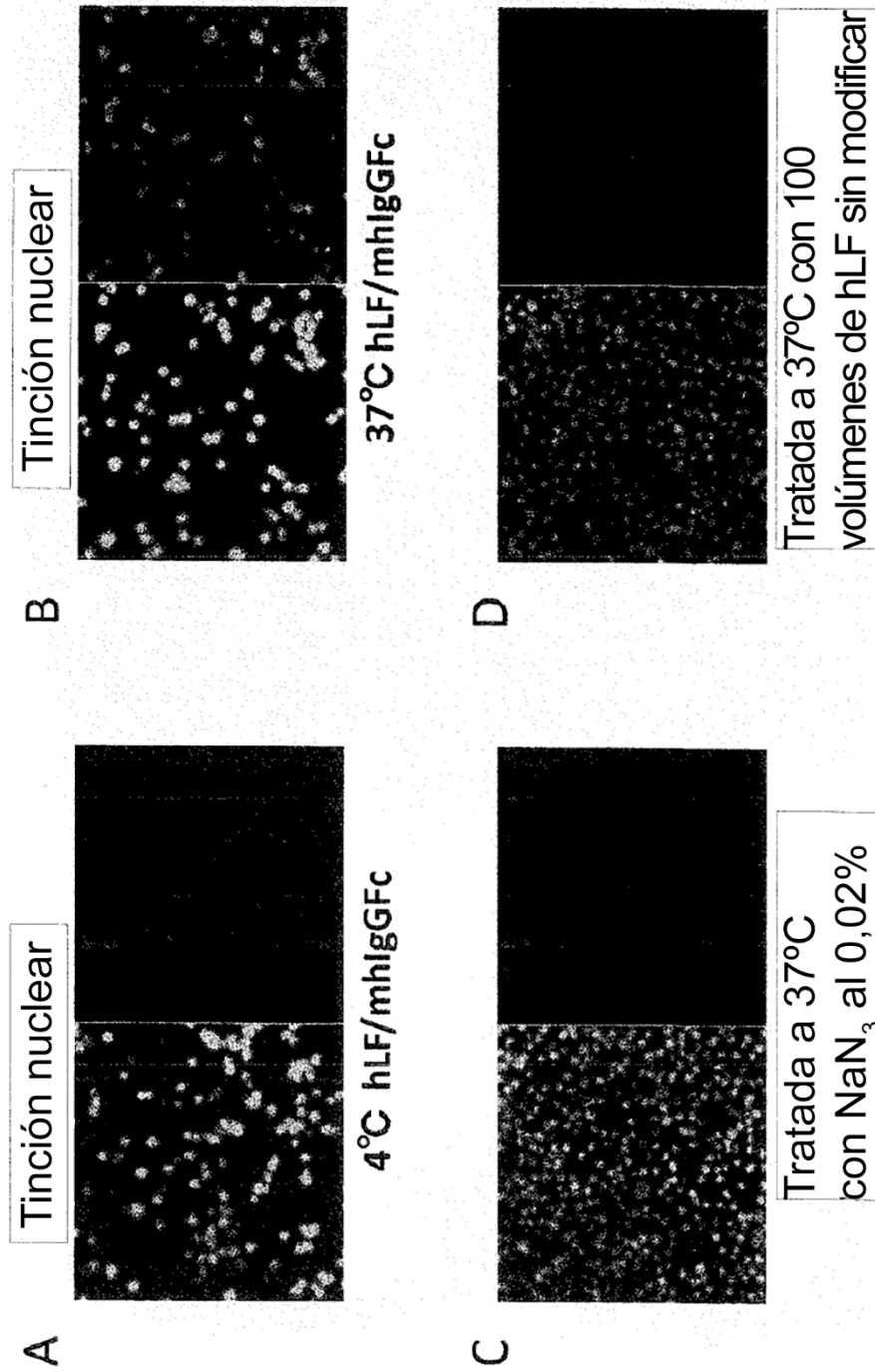


Figura 20

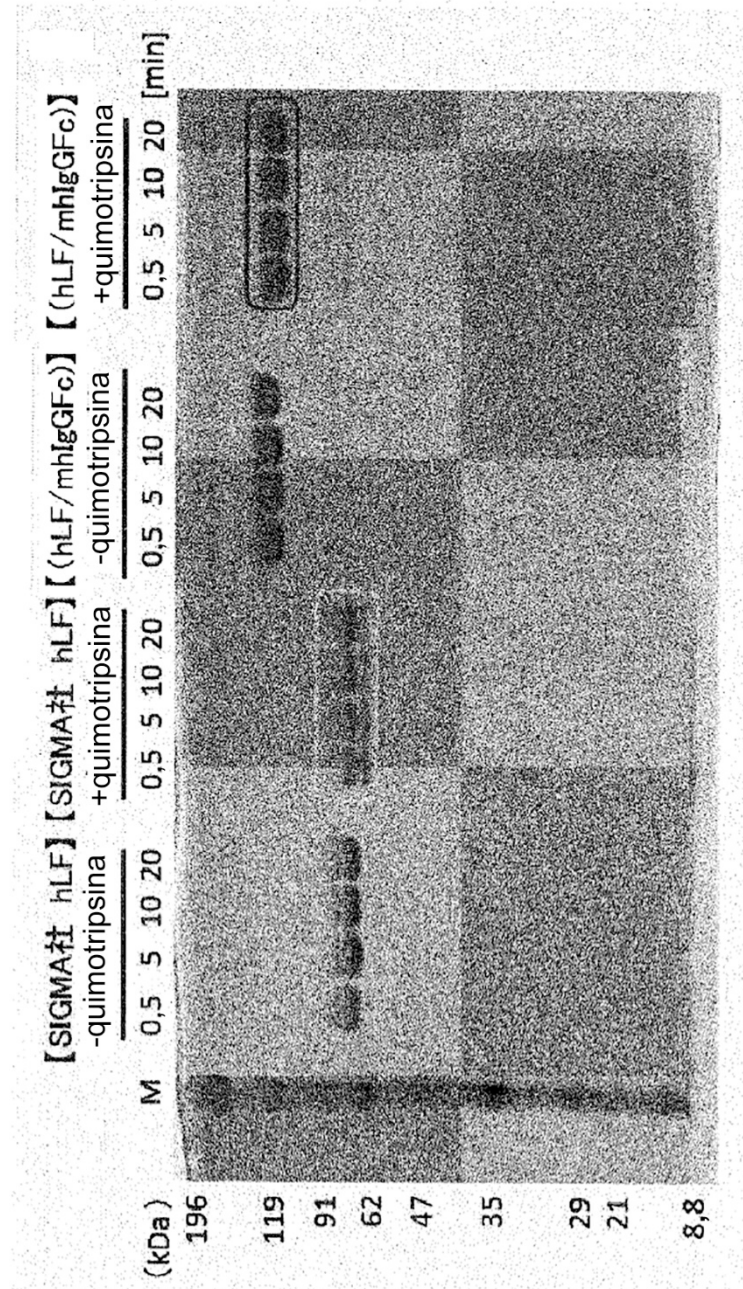
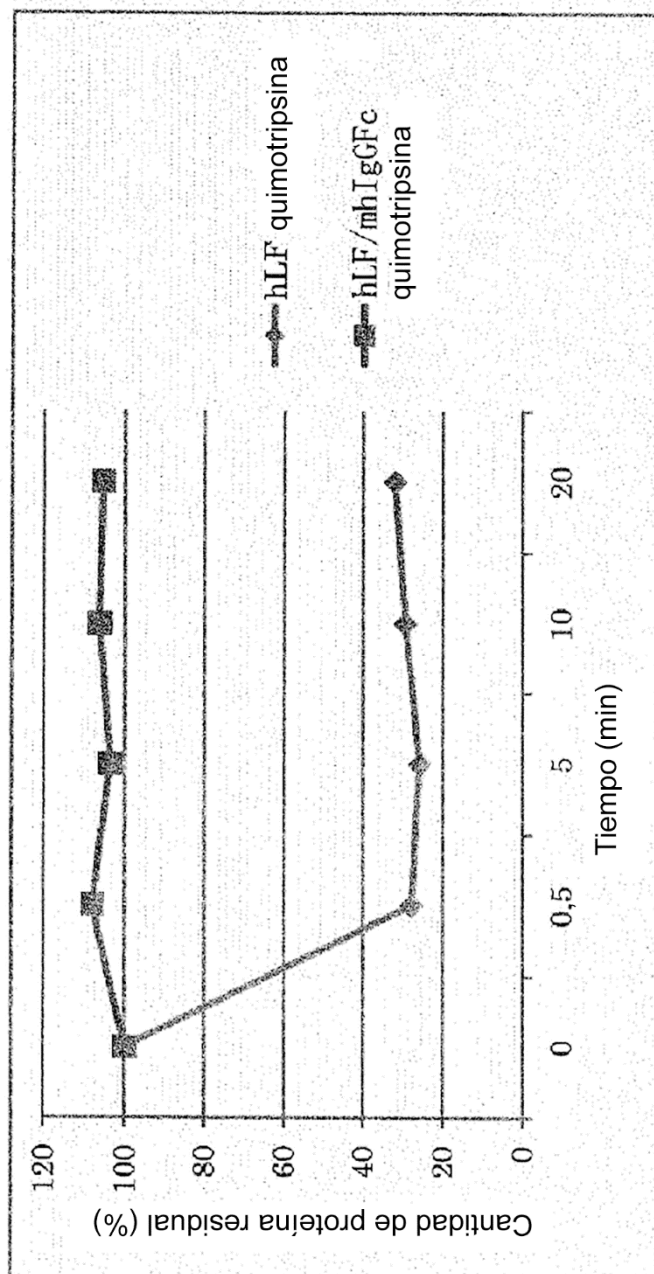


Figura 21



Resultados del análisis de
resistencia a quimotripsina

Figura 22

