

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 983**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505	(2006.01)
C07K 14/52	(2006.01)
C07K 14/59	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
A61P 7/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2013 PCT/CN2013/089544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14094579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013 E 13863709 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2937362**

54 Título: **Proteína recombinante**

30 Prioridad:

18.12.2012 CN 201210551666

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

01.10.2018

73 Titular/es:

**UBI PHARMA INC. (100.0%)
No. 45, Guangfun N. Road, Hukou Township,
Hsinchu County
Taiwan 30351, TW**

72 Inventor/es:

**PENG, WEN-JIUN;
YANG, SHU-PING;
PENG, HUNG-CHIH y
CHEN, YU-HUNG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 683 983 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 recombinante

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una eritropoyetina altamente glicosilada (EPO) con una semivida más larga.

5 Antecedentes de la invención

La eritropoyesis (EPO) es una hormona glicoproteica, o una citoquina de precursores de glóbulos rojos en la médula ósea. En humanos, la eritropoyesis está involucrada en el proceso de los glóbulos rojos y la modulación de la hormona. Simultáneamente, la eritropoyesis también tiene otras funciones biológicas. Por ejemplo, la eritropoyesis está involucrada en el proceso de cicatrización de heridas cuando hay daño nervioso.

- 10 La eritropoyesis es la producción de glóbulos rojos, que se produce para compensar la destrucción celular. La eritropoyesis es un mecanismo fisiológico controlado que permite que haya suficientes glóbulos rojos disponibles para la oxigenación tisular adecuada. La eritropoyetina humana de origen natural (hEPO) se produce en el riñón y es el factor del plasma humoral que estimula la producción de glóbulos rojos (Carnot, P y Deflandre, C (1906) CR Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953) Blood 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W y Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4.) La EPO estimula la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea y ejerce su actividad biológica uniéndose a receptores en precursores eritroides (Krantz, BS (1991) Blood 77: 419).

- 15 La eritropoyetina se ha fabricado de forma biosintética utilizando tecnología de ADN recombinante (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) y es el producto de un gen de EPO humana clonado insertado y expresado en las células del tejido de ovario del hámster chino (células CHO). El peso molecular de la cadena polipeptídica de EPO sin los restos de azúcar es de 18.236 Da. En la molécula de EPO intacta, aproximadamente el 40% del peso molecular se explica por los grupos carbohidrato que glicosilan la proteína en los sitios de glicosilación de la proteína (Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A y Fukuda, M (1987) J Biol. Chem. 262: 12059).

- 20 Debido a que la eritropoyetina humana es esencial en la formación de glóbulos rojos, la hormona es útil en el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por una producción de glóbulos rojos baja o defectuosa. Clínicamente, la EPO se usa en el tratamiento de la anemia en pacientes con insuficiencia renal crónica (CRF) (Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) y en pacientes con SIDA y cáncer sometidos a quimioterapia (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI en: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. Nueva York, NY: Marcel Dekker; 1990: págs. 301-324). Sin embargo, la biodisponibilidad de la proteína EPO terapéutica está limitada por su corta semivida en plasma y por la degradación de la proteasa, de modo que es difícil alcanzar una buena potencia clínica.

25 Sumario de la invención

- 35 La invención proporciona una eritropoyetina (EPO) altamente glicosilada con una semivida larga.

Para alcanzar el objetivo, la invención proporciona una proteína recombinante, que comprende una eritropoyetina y un péptido altamente glicosilado localizado en el extremo terminal amino o en el extremo carboxiterminal de la eritropoyetina y en el que el péptido altamente glicosilado se define por la SEQ ID NO: 1 o 2 o una combinación de las mismas. La invención proporciona además un nucleótido que codifica la proteína recombinante.

- 40 La invención también proporciona una célula que se transfecta con el nucleótido para expresar la proteína recombinante.

La invención proporciona además una composición que comprende la proteína recombinante y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

- 45 Para lograr el propósito indicado anteriormente, así como para otros propósitos, las características y ventajas de la presente invención pueden ser más evidentes y comprensibles, y las realizaciones preferidas se ejemplifican a continuación con los dibujos adjuntos para ayudar en la interpretación detallada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la construcción del plásmido de EPO-NNCT, NNCT-EPO, EPO-N1N2, N1N2-EPO, EPO-N1 y EPO-N2 de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

La Figura 2 ilustra la comparación de los niveles de actividad entre EPO-NNCT de la presente invención y Eprex® comercial.

5 La Figura 3 ilustra la comparación de propiedades farmacocinéticas (PK) entre EPO-NNCT de la presente invención y Eprex® comercial (inyección intravenosa).

La Figura 4 ilustra la comparación de propiedades farmacocinéticas (PK) entre EPO-NNCT de la presente invención y Eprex® comercial (inyección subcutánea).

10 La Figura 5 ilustra la comparación de propiedades farmacocinéticas (PK) entre EPO-N1N2, N1N2-EPO, NNCT-EPO de la presente invención y Eprex® comercial (inyección subcutánea).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una eritropoyetina recombinante con una semivida larga como se define en la reivindicación 1 y un método de fabricación de la misma.

15 En una realización, la presente invención proporciona una proteína recombinante, que comprende una eritropoyetina y un péptido altamente glicosilado localizado en el extremo terminal amino o en el extremo carboxiterminal de la eritropoyetina y en el que el péptido altamente glicosilado está definido por la SEQ ID NO: 1 o 2 o una combinación de las mismas.

20 Como se usa en el presente documento, la frase "eritropoyetina (EPO)" usada en la presente memoria incluye EPO de cualquier origen, especialmente EPO humana o animal. El término utilizado en la presente invención abarca no solo las formas de EPO de origen natural, es decir, formas de tipo silvestre, sino también sus derivados, análogos, modificaciones, mutantes u otros, siempre que muestren los efectos biológicos de la eritropoyetina de tipo silvestre.

25 Se incluye también cualquier proteína que tenga la actividad de EPO, tal como muteínas o bien proteínas modificadas. La EPO recombinante puede prepararse por expresión en líneas celulares CHO, BHK, COS, HeLa o PER.C6 u otras líneas celulares apropiadas, mediante tecnología de ADN recombinante y el contenido relacionado se puede consultar en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.733.761, 5.641.670, 5.733.746, 5.994.122, 5.733.761, 5.641.670, 5.981.214 y 5.272.071. Su preparación y aplicación terapéutica se pueden consultar en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.547.933 y 5.621.080, Huang, S. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708 - 2712, así como Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116 - 3121, y Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. Las especies preferidas de EPO son especies humanas de EPO.

30 Como se usa en este documento, la frase "péptido altamente glicosilado" se refiere a un polipéptido que tiene aproximadamente de 10 a 30 residuos de aminoácidos con al menos un glucósido. El péptido altamente glicosilado de la presente invención se define por la SEQ ID NO.1 o 2 o una combinación de las mismas.

35 El péptido altamente glicosilado se fusiona con una EPO para formar la proteína recombinante de la presente invención. El péptido altamente glicosilado puede estar localizado en el extremo N-terminal (N-ter) o en el extremo C-terminal (C-ter) de la EPO, y el número de péptidos altamente glicosilados no está limitado. Por ejemplo, uno o más péptidos altamente glicosilados iguales o diferentes se pueden unir al extremo N-terminal y/o al extremo C-terminal de la EPO. La proteína recombinante que contiene el péptido altamente glicosilado tiene una semivida más larga y una actividad más alta. En una realización, el péptido altamente glicosilado (SEQ ID NO: 1 y/o 2) puede localizarse en el N-ter o C-ter de EPO, como se muestra en la Fig. 1.

40 El péptido altamente glicosilado se define por la SEQ ID NO: 1 o 2 o una combinación de las mismas. Uno o más péptidos altamente glicosilados iguales o diferentes se pueden unir al C-ter de EPO. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o 2 está unida al C-ter de EPO; o dos o más SEQ ID NO: 1 o 2 están unidas al C-ter de EPO; o la SEQ ID NO: 1 y 2 están unidas al C-ter de EPO, secuencialmente; o las SEQ ID NO: 2 y 1 están unidas al C-ter de EPO, secuencialmente. En otra realización, las SEQ ID NO: 1 y 2 están unidas al C-ter de EPO, secuencialmente.

45 La proteína recombinante de la presente invención comprende además un péptido carboxiterminal de gonadotropina coriónica humana (hCG).

Como se usa en el presente documento, la frase "péptido carboxiterminal de hCG (denominado en lo sucesivo CTP)" se refiere a una secuencia de aminoácidos encontrada en el terminal carboxilo de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana que se extiende desde el aminoácido 112-118 hasta el residuo 145 en el C-terminal

o hasta una porción, o una variante o análogo del mismo, que tiene una actividad biológica equivalente. El péptido de la secuencia de CTP tiene 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 aminoácidos de longitud y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia de aminoácidos de hCG.

5 El CTP de la presente invención consiste en la SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia.

El CTP de la invención está unido al péptido altamente glicosilado (en el C-ter). La cantidad de CTP no está limitada. Por ejemplo, uno o más CTP iguales o diferentes de hCG pueden unirse al C-ter del (de los) péptido(s) altamente glicosilado(s) de la invención.

10 El CTP de la presente invención puede actuar como un protector contra la degradación de proteínas o péptidos. En la presente solicitud, el CTP de hCG puede extender la semivida en circulación de las proteínas recombinantes y mejora la potencia de las proteínas recombinantes.

La invención comprende además un péptido carboxiterminal de trombopoyetina (TPO).

15 Como se usa en este documento, la frase "péptido carboxiterminal de trombopoyetina (en lo sucesivo denominado TpS)" se refiere a aminoácidos en las posiciones 176 a 353 de trombopoyetina, particularmente los aminoácidos en las posiciones 337 a 353 de trombopoyetina, o una variante o análogo de la misma, que tiene actividad biológica equivalente.

El TpS de la invención consiste en la SEQ ID NO: 4, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4, preferiblemente al menos 95%, o 99% de identidad de secuencia.

20 El TpS de la presente invención está unido al CTP (en el C-ter) y la cantidad del TpS no está limitada. Se pueden unir uno o más TpS iguales o diferentes al N-ter de EPO o al C-ter del CTP.

El TpS de la presente solicitud puede actuar como un protector contra la degradación de proteínas o péptidos derivados del mismo. El TpS puede extender la semivida en circulación de las proteínas recombinantes y mejorar la potencia de las proteínas recombinantes.

25 En la presente invención, la cantidad y la disposición de EPO, el péptido altamente glicosilado, CTP y TpS no están limitados.

En una realización, la proteína recombinante de la presente invención comprende las SEQ ID NOS: 1, 2, 3 y 4.

En otra realización, la proteína recombinante de la presente invención puede seleccionarse de la SEQ ID NO: 5 (EPO-NNCT), 6 (NNCT-EPO), 7 (EPO-N1N2), 8 (N1N2-EPO), 9 (EPO-N1), o 10 (EPO-N2).

30 El CTP y el TpS también se pueden modificar mediante eliminación, sustitución, inserción y/o modificación química. El método y el proceso de eliminación, sustitución, inserción y/o modificación química de aminoácidos son bien conocidos en la técnica, y el CTP y TpS todavía mantienen la actividad original después de la modificación.

35 En una realización, las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación del N-terminal, modificación del C-terminal, modificación del enlace polipeptídico, tales como CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la cadena principal y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se puede hacer mención a Quantitative Drug Design, CA Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992).

40 En una realización, el enlace peptídico (-CO-NH-) del polipéptido puede estar sustituido, tal como, un enlace N-metilo (-N(CH₃)-CO), enlace éster (-C(R)H-COOC(R)-N-), cetometileno (-CO-CH₂), enlace α -aza (-NH-N(R)-CO-), en el que R es cualquier enlace alquilo, hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), tioamida (-CS-NH-), enlaces alqueno (-CH=CH-), enlace amida (-NH-CO-), o derivado polipeptídico (-N(R)-CH₂-CO-).

La presente invención proporciona además un polinucleótido que codifica la proteína recombinante de la presente invención.

45 La frase "un polinucleótido o nucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla o doble que se aísla y se proporciona en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótido complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótido genómico y/o combinación de las anteriores.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar usando técnicas de PCR, o cualquier otro método o procedimiento conocido por los expertos en la técnica. El procedimiento implica la ligación de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", editores Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

5 Los polinucleótidos de la invención pueden insertarse en vectores de expresión para permitir la expresión de la proteína recombinante. En una realización, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariotas o eucariotas. En otra realización, los vectores de expresión comprenden secuencias de inicio de la transcripción y la traducción (por ejemplo, promotores o potenciadores) y terminadores de transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

10 Se puede usar una variedad de células procariotas o eucariotas como sistemas de expresión del huésped para expresar los polipéptidos de la presente invención. En una realización, estos sistemas de expresión incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias, levaduras, células vegetales, eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, células CHO), etc.

15 Los métodos para la transformación se pueden encontrar en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504 - 512, 1986], e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes.

20 La presente invención de la invención proporciona además una composición que comprende la proteína recombinante de la invención y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

25 Las frases "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" que se usan indistintamente se refieren a un vehículo, excipiente o adyuvante que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. El vehículo comprende, pero no se limita a, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con solubilidad tanto en medios orgánicos como acuosos. Los excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

30 La composición de la presente invención se puede usar para tratar a un paciente que tiene anemia, un paciente anémico que tiene insuficiencia renal crónica, un paciente anémico que tiene enfermedad renal en etapa terminal, un paciente anémico sometido a diálisis, un paciente anémico que tiene insuficiencia renal crónica, un paciente anémico infectado por VIH, un paciente anémico que tiene cáncer, un paciente anémico sometido a quimioterapia y un paciente anémico programado para someterse a cirugía no cardíaca, no vascular.

35 Después de que una cantidad eficaz de la composición de la presente invención se administre a un paciente con anemia, el nivel de hematocritos (Ht) del paciente con anemia puede aumentarse significativamente, y la EPO recombinante con alta glicosilación de la presente invención tiene una semivida más larga en un sujeto. La EPO recombinante con alta glicosilación de la presente invención tiene una semivida más larga que la de los productos de EPO comerciales (por ejemplo, Eprex® y Aranesp®). Por ejemplo, la EPO altamente glicosilada de la presente invención tiene una semivida de al menos aproximadamente 1 vez más que los productos comerciales de EPO, preferiblemente, 2 veces, más preferiblemente, 3 veces. En otra realización, la EPO altamente glicosilada de la presente invención tiene una semivida más larga, un AUC (área bajo curva) y C_{máx} más altos, y valores de T_{máx} mayores que los de los productos EPO comerciales (por ejemplo, Eprex® y Aranesp®).

45 La frase "terapéuticamente eficaz" generalmente se refiere a, desde aproximadamente 1 a 10.000 UI/kg, preferiblemente de aproximadamente 50 a 2.000 UI/kg, más preferiblemente de aproximadamente 50 a 600 UI/kg, y lo más preferiblemente de aproximadamente 50 a 300 UI/kg de peso corporal. Las formulaciones de la presente invención se pueden administrar a cualquier frecuencia o intervalo de tiempo deseado entre administraciones. En un régimen de dosificación, al sujeto se le administran las formulaciones de liberación sostenida de la presente invención tres veces por dos semanas, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas o en intervalos más frecuentes o menos frecuentes, o en cualquier combinación de frecuencias o intervalos de tiempo según se desee. La dosificación requerida variará de acuerdo con una serie de factores conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el compuesto o compuestos usados, la especie de sujeto, el tamaño del sujeto y la gravedad de la condición de enfermedad asociada con la anemia. Un régimen de dosificación preferido puede ser una vez cada tres semanas, particularmente para sujetos que reciben quimioterapia para el tratamiento de cáncer, ya que muchos regímenes de quimioterapia se administran en un programa de una vez por tres semanas.

Ejemplo**Ejemplo 1**

Células huésped

5 Las células se adquirieron a través del Centro de Investigación y Colección de Cultivos (CCRC, 60133) del Instituto de Investigación y Desarrollo de la Industria de Alimentos, Taiwán. Las células CHO dhfr se cultivaron en medio IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove, IMDM, Gibco Cat. 12200-36) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco Cat. 10091148) más hipoxantina y timidina (Gibco, Cat. 11067-030) y L-glutamina 2 mM (Gibco Cat. 25030-081). Se usó el marcador dhfr(-) para la amplificación y selección. La expresión del gen de dhfr podría amplificarse mediante un desafío con el inhibidor de la dihidrofolato reductasa, metotrexato (MTX, Sigma Cat. N° M8407). Cuando se amplificaron los genes de dhfr, a menudo se amplificaron al mismo tiempo otros genes vecinos, de modo que después de cada ronda de amplificación, se subclonaron las células para seleccionar clones con tasas de producción mayores. Las células se cultivaron en una incubadora con 95% de aire humidificado / 5% de CO₂ a 37°C (Modelo 3326, Forma de Scientific).

Ejemplo 2

15 Construcción de los vectores de expresión

2.1 EPO-NNCT

El fragmento del gen de EPO-NNCT se obtuvo usando el método de PCR de ensamblaje y luego se insertó en el vector pcDNA3.1/Neo(+)/DHFR, produciendo pND/EPO-NNCT. La construcción del vector de expresión contenía el gen de resistencia a la neomicina como marcador selectivo. El gen de EPO-NNCT se muestra en la Fig. 1, en donde la "EPO" es una eritropoyetina, "N1" es un péptido 1 altamente glicosilado (SEQ ID NO: 1), "N2" es un péptido 2 altamente glicosilado (SEQ ID NO: 2), "CTP" es el péptido carboxiterminal de hCG (SEQ ID NO: 3), y "TpS" es el péptido carboxiterminal de trombopoyetina (SEQ ID NO: 4).

2.2 NNCT-EPO

25 El fragmento de ADN de NNCT fue reproducido mediante PCR usando el cebador LSP-N-S1 (3'-cctagggccaccatggtggg tgcacgaatgtcctgctggctgtggcttctcctgctccctgctgctcctctgg-5'), el cebador LSP-N-S2 (3'-ctgctccctgctgctgctccctctggcct cccagctctgggagggccgagagaatcaccgacggcggtaac-5'), y los cebadores ENNCT1-A (3'-ctcggctgtcacagatgaggcgtgggggg cccctcctgagacagattctgggagtggtgtaggatg-5') del plásmido pND/EPO-NNCT para obtener el fragmento de NNCT-EPO como se muestra en la Fig. 1. El fragmento de NNCT-EPO luego se insertó en un vector de expresión para obtener el vector pPD/NNCT-EPO. El vector de expresión contenía el gen de resistencia a la puromicina como marcador selectivo.

2.3 EPO-N1N2

35 El fragmento de ADN de EPO-N1N2 se reprodujo mediante PCR usando el cebador E-S (3'-cctagggccaccat gggggtgcacgaatgtcctgccc-5') y el cebador ENNCT2-A (3'-gtatacctacagctgcagagctcgttcacctgggaagag-5') del plásmido pND/EPO-NNCT para obtener el fragmento de EPO-N1N2 como se muestra en la Fig. 1. El fragmento de EPO-N1N2 luego se insertó en un vector de expresión para obtener el vector pPD/EPO-N1N2. El vector de expresión contenía el gen de resistencia a la puromicina como marcador selectivo.

2.4 N1N2-EPO

40 El fragmento de ADN de N1N2-EPO fue sintetizado por GENEWIZ, Inc. (como se muestra en la Fig. 1), y se insertó en un vector de expresión para obtener el vector pPD/N1N2-EPO. El vector de expresión contenía el gen de resistencia a la puromicina como marcador selectivo.

2.5 EPO-N1

45 El fragmento de ADN de EPO-N1 se reprodujo mediante PCR usando el cebador E-S (3'-cctagggccaccatggtggg tgcacgaatgtcctgccc-5') y el cebador ENNCT4-A (3'-gtatacctagtctgggacagtgatattctc-5') del plásmido pND/EPO-NNCT como se muestra en Fig. 1. El fragmento de EPO-N1 se insertó en un vector de expresión para obtener pPD/EPO-N1. El vector de expresión contenía el gen de resistencia a la puromicina como marcador selectivo.

2.6 EPO-N2

El fragmento de ADN de EPO-N2 se obtuvo mediante el método de PCR usando el cebador E-S (3'-cctaggccaccat gggggtgcacgaatgtctctgcc-5') y el cebador ENNCT5-A (3'-gtatacctacagctgcagagtctcgttcacctgggaagagttgaccaacagctgtg cccctgtctctgcaggctccc-5') del plásmido pND/EPO-NNCT para obtener el fragmento de EPO-N2 como se muestra en la Fig. 1. El fragmento de EPO-N2 luego se insertó en un vector de expresión para obtener el plásmido pPD/N1. El vector de expresión contenía el gen de resistencia a la puromicina como marcador selectivo.

Ejemplo 3

Establecimiento de líneas celulares recombinantes

El vector que contenía el gen de EPO-NNCT se transfectó en células CHO dhfr- por electroporación (electroporador PA4000 PulseAgile®, Cyto Pulse Sciences). Las células se tripsinizaron primero y se resuspendieron a una concentración de 3×10^6 células/mL en regulador CP-T (Cyto pluse Cat. CP-T). Se mezclaron 200 μ L de suspensión celular (6×10^5 células) con 10 μ g de pND/BMP2 y se sometieron a electroforesis. Las células sometidas a electroforesis se cultivaron en un medio completo (IMDM con 10% de suero bovino fetal y suplemento HT) sin sustancia selectiva para el crecimiento de la recuperación. Después de 48 horas de crecimiento en medio sin sustancia selectiva, las células se transfirieron al medio completo que contenía IMDM, 10% de suero bovino fetal, L-glutamina y MTX 5 nM, con sustancia selectiva. Después de aproximadamente 2 semanas de período de cultivo, las líneas celulares se transfirieron a placas de 96 pozos, y las líneas celulares que expresan alto nivel de rhBMP-2 se seleccionaron mediante la cuantificación del nivel de proteína por ELISA. Las células seleccionadas se cultivaron en un medio selectivo. Las células se diluyeron hasta una concentración de 1 célula / 100 μ L y luego se transfirieron a una placa de 96 pozos para cultivarlas para que crecieran en racimos celulares. Las células con alto nivel de expresión se seleccionaron de acuerdo con los resultados de ELISA y las concentraciones de MTX se incrementaron gradualmente desde 0,005, 0,01, 0,02 hasta 0,05 μ M.

Ejemplo 4

Cultivo por lotes

Se cultivaron por lotes 4×10^5 células/mL de la línea celular recombinante obtenida del Ejemplo 3 en un matraz de 50 mL que contenía medio sin suero. Las células se monitorizaron todos los días y el medio de cultivo se recogió para medir la concentración de la EPO y seleccionar un clon de alto rendimiento bajo desafío con MTX 0,02 μ M. En el cultivo de centrifugación, la productividad acumulada de EPO-NNCT fue de 140,69 μ g/mL, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del cultivo por lotes

Rendimiento máximo (μ g/mL)	140,9
Concentración celular máxima (10^6 células/mL)	2,42
IVC (10^6 células-día)	14,60
q (pg/células/día)	9,63

Ejemplo 5

Ensayo de bioactividad

El proceso y el procedimiento del ejemplo se llevaron a cabo de acuerdo con la divulgación de la Farmacopea Europea 5.2 (solución concentrada de eritropoyetina). Se clasificaron los ratones hembra BALB/c de 8 semanas en dos grupos, y se les inyectó por vía subcutánea 21, 42, 84, 168, 336 y 672 ng/mL de EPO-NNCT de la invención y Eprex®, individualmente. Después de la inyección, se recogieron 0,25 mL de sangre entera. Después de teñir las células, se las analizó mediante citometría de flujo y software CellQuest Pro, y los resultados se muestran en la Tabla 2. En referencia a la Fig. 2, en la misma dosificación, el número promedio de reticulocitos de los ratones a los que se les administró EPO- El NNCT de la presente invención fue más alto que el de los ratones a los que se les administró Eprex®.

Tabla 2. Cantidad de reticulocitos después de la inyección

	Inyección subcutánea (ng/mL)	Reticulocitos (media en %)
EPO-NNCT	672	23,15
	336	19,45
	168	16,14
	84	13,17
	42	11,47
	21	10,52
Eprex®	672	15,50
	336	14,05
	168	11,57

5 Se clasificaron 25 ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad en cinco grupos, y se les inyectó por vía subcutánea 336 ng/mL de EPO-NNCT y Eprex®, individualmente. Se recolectó sangre entera de los ratones entre 4 y 9, y 13 días después de la inyección. El porcentaje de reticulocitos se determinó mediante citometría de flujo y se analizó mediante el software CellQuest Pro. Como se muestra en la Tabla 3, la cantidad (media en %) de reticulocitos fue máxima en el Día 7 en los ratones inyectados con la EPO-NNCT de la invención y significativamente más alta que la de Eprex®.

Tabla 3. Cantidad de reticulocitos en diferentes días después de la inyección

	Día	Reticulocitos (media en %)	SD	CV
EPO-NNCT	5	20,33	2,38	11,70
	6	27,26	1,99	7,29
	7	28,12	2,11	7,51
	8	25,42	2,17	8,55
	9	16,37	3,09	18,89
	13	5,21	0,53	10,19
Eprex®	5	11,28	1,56	13,86
	6	7,42	0,81	10,97
	7	6,35	1,16	18,22
	8	11,11	1,22	10,95
	9	10,76	2,40	22,31

	Día	Reticulocitos (media en %)	SD	CV
	13	8,61	0,92	10,67

Ejemplo 6

Ensayo farmacocinético

- 5 Se clasificaron 14 ratones hembra BALB/c de 8 semanas en cuatro grupos, y se les inyectó por vía intravenosa y subcutánea 2.000 UI/kg de EPO-NNCT de la invención, Eprex® y Aranesp®, individualmente. La sangre de los ratones se recogió a los 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 5 h, 8 h, 24 h, 30 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 168 h, 216 h, 264 h, y 336 h después de la inyección, se centrifugó para obtener el suero, y luego se almacenó el suero a -70°C.
- 10 El ensayo farmacocinético se llevó a cabo utilizando el kit de ELISA Quantikine® IVD® Epo para medir la densidad óptica a 450 nm y 600 nm y luego se analizó mediante el software SoftMax® Pro 5. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Con referencia a las Fig. 3-4, en comparación con Eprex® y Aranesp®, EPO-NNCT de la presente invención tenía una semivida más larga (aproximadamente 25-26 horas) y un valor de AUC más alta (área bajo la curva) (aproximadamente 8.387-4.502 ng·h/mL).

Tabla 4. Propiedades farmacocinéticas de EPO-NNCT

	semivida (h)	AUC (ng·h/mL)	C _{máx} (ng/mL)	T _{máx} (h)
inyección intravenosa				
EPO-NNCT (n = 2)	25,03	8387,44	-	-
Aranesp® (n = 2)	17,89	5694,75	-	-
Eprex® (n = 3)	6,35	269,96	-	-
inyección subcutánea				
EPO-NNCT (n = 2)	26,53	4502,90	68,19	24
Aranesp® (n = 2)	17,78	2547,34	58,16	24
Eprex® (n = 3)	7,14	169,55	6,88	10

- 15 De manera similar, en comparación con Eprex®, EPO-N1N2, N1N2-EPO y NNCT-EPO de la presente invención también tenían una semivida más larga (21-30 horas) y un valor de AUC (área debajo de la curva) más alto (370-981 ng·h/mL), como se muestra en la Tabla 5.

Además, EPO-N1 y EPO-N2 tenían una T_{máx} de aproximadamente 24 horas. Por consiguiente, se sabe que EPO-N1 y EPO-N2 tenían una T_{máx} mayor en comparación con Eprex® comercial.

- 20 Tabla 5. Propiedades farmacocinéticas de EPO-N1N2, N1N2-EPO, NNCT-EPO y Eprex® (inyección subcutánea)

	semivida (h)	AUC (ng·h/mL)	C _{máx} (ng/mL)	T _{máx} (h)
EPO-N1N2	21,76	370,47	11,77	24
N1N2-EPO	30,14	448,04	13,78	30
NNCT-EPO	25,50	981,63	26,18	24

ES 2 683 983 T3

Val Pro Asp Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Val Asn Glu Thr Leu Gln
1 5 10 15

Leu

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 4

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 5

15 <211> 275

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 5

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

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

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

ES 2 683 983 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Gly Asn Glu Thr Gly Ser Leu
195 200 205

Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Val
210 215 220

Asn Glu Thr Leu Gln Leu Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
225 230 235 240

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
245 250 255

Pro Gln Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser
260 265 270

Gln Glu Gly
275

ES 2 683 983 T3

<210> 6

<211> 275

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <400> 6

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Gly Asn Glu Thr Gly Ser Leu Asn
1 5 10 15

Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Val Asn
20 25 30

Glu Thr Leu Gln Leu Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
35 40 45

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
50 55 60

Gln Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln
65 70 75 80

Glu Gly Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu
85 90 95

Ser Leu Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro
100 105 110

Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala
115 120 125

Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu
130 135 140

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

Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu
165 170 175

Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn
180 185 190

Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val
195 200 205

ES 2 683 983 T3

Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln
210 215 220

Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg
225 230 235 240

Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn
245 250 255

Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr
260 265 270

Gly Asp Arg
275

<210> 7

<211> 230

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 7

ES 2 683 983 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 683 983 T3

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

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

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

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

Arg Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Gly Asn Glu Thr Gly Ser Leu
195 200 205

Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Val
210 215 220

Asn Glu Thr Leu Gln Leu
225 230

<210> 8

<211> 230

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 8

ES 2 683 983 T3

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Gly Asn Glu Thr Gly Ser Leu Asn
 1 5 10 15

Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Val Asn
 20 25 30

Glu Thr Leu Gln Leu Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp
 35 40 45

Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
 50 55 60

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75 80

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

ES 2 683 983 T3

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 100 105 110

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 115 120 125

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 130 135 140

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 145 150 155 160

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 165 170 175

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 180 185 190

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 195 200 205

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 210 215 220

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 225 230

<210> 9

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 9

ES 2 683 983 T3

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

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

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

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

ES 2 683 983 T3

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

<210> 10

<211> 210

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 10

ES 2 683 983 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Pro Asp Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Val Asn Glu Thr Leu
195 200 205

Gln Leu
210

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante, que comprende una eritropoyetina y un péptido altamente glicosilado localizado en el extremo terminal amino o en el extremo carboxiterminal de la eritropoyetina y en el que el péptido altamente glicosilado se define por la SEQ ID NO: 1 o 2 o una combinación de las mismas.
- 5 2. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extremo carboxiterminal de la eritropoyetina está unido al péptido altamente glicosilado.
3. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extremo terminal amino de la eritropoyetina está unido al péptido altamente glicosilado.
- 10 4. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además un péptido carboxiterminal de gonadotropina coriónica humana, en el que dicho péptido carboxiterminal de gonadotropina coriónica humana consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, y el extremo carboxiterminal del péptido altamente glicosilado está unido a dicho péptido carboxiterminal de la gonadotropina coriónica humana.
- 15 5. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además un péptido carboxiterminal de trombopoyetina, en el que dicho péptido carboxiterminal de trombopoyetina consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 4, y en el que el extremo carboxiterminal del péptido carboxiterminal de la gonadotropina coriónica humana está unido a dicho péptido carboxiterminal de trombopoyetina.
6. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína recombinante comprende la SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.
- 20 7. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante de la reivindicación 1.
8. Una célula transfectada con la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 7 para expresar la proteína recombinante de la reivindicación 1.
9. Uso de una célula de acuerdo con la reivindicación 8 para expresar la proteína recombinante de la reivindicación 1.
- 25 10. Una composición que comprende la proteína recombinante de la reivindicación 1 y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

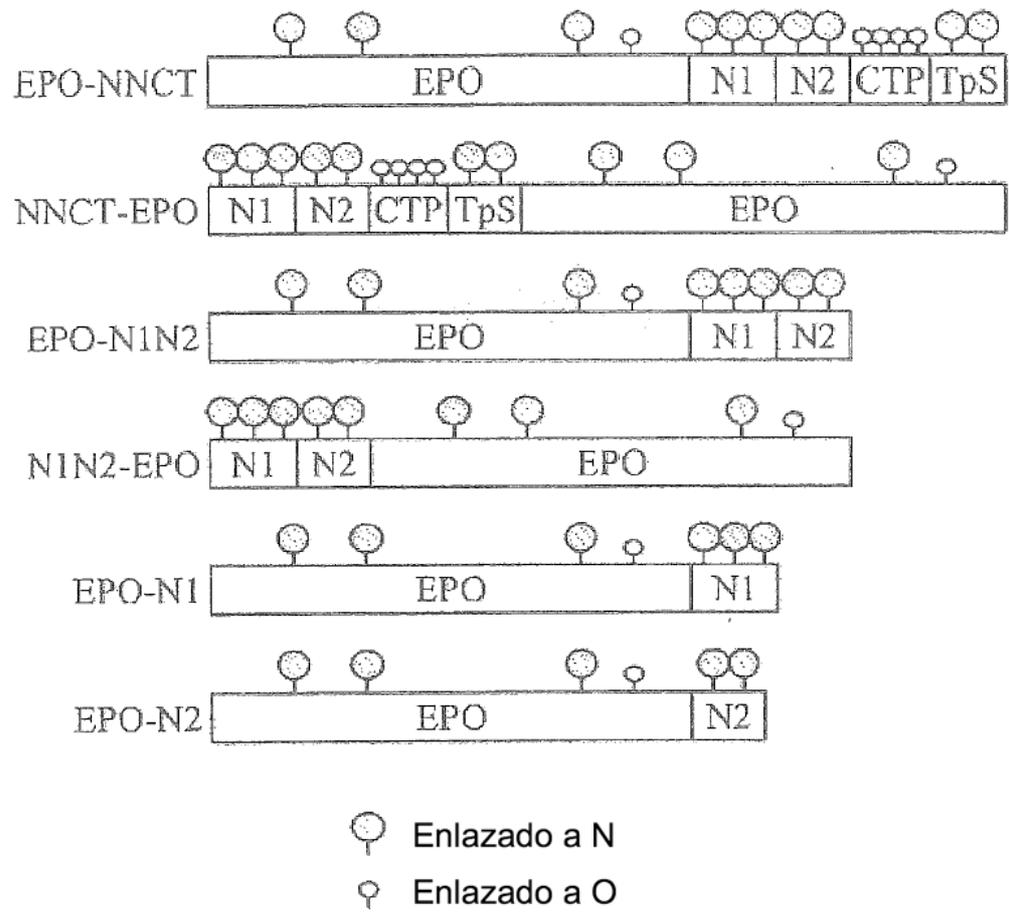


Fig. 1

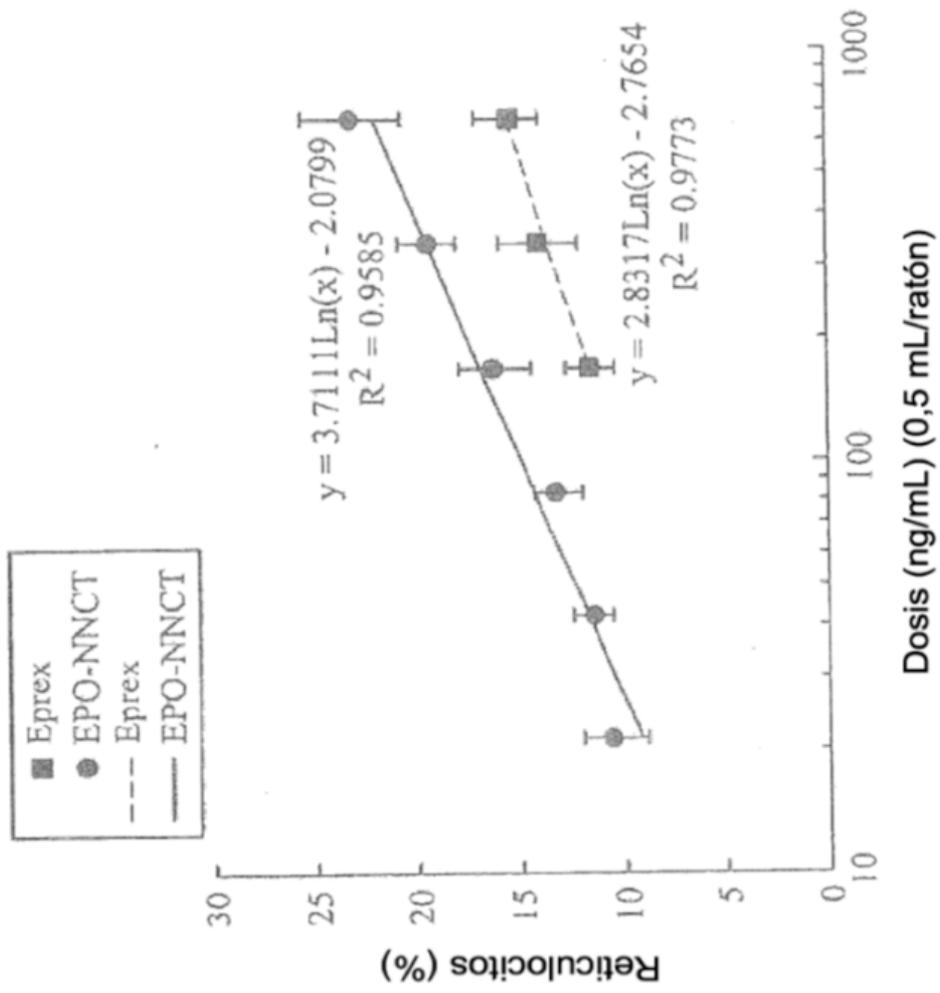


Fig. 2

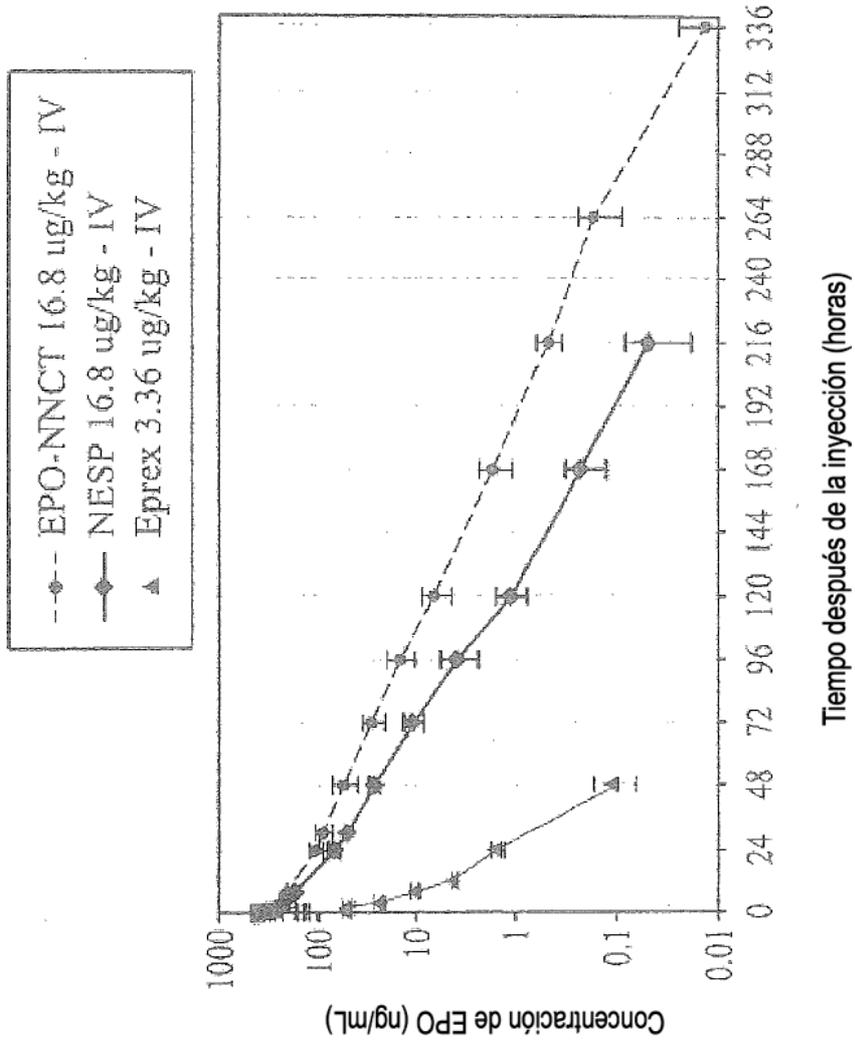


Fig. 3

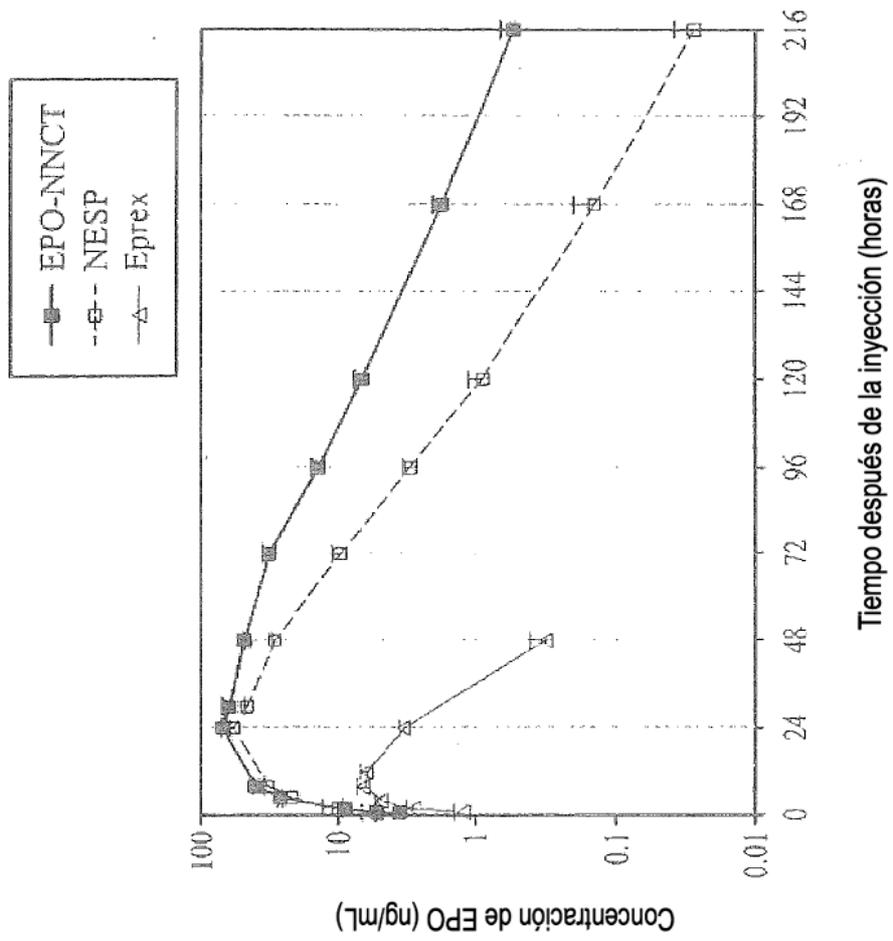


Fig. 4

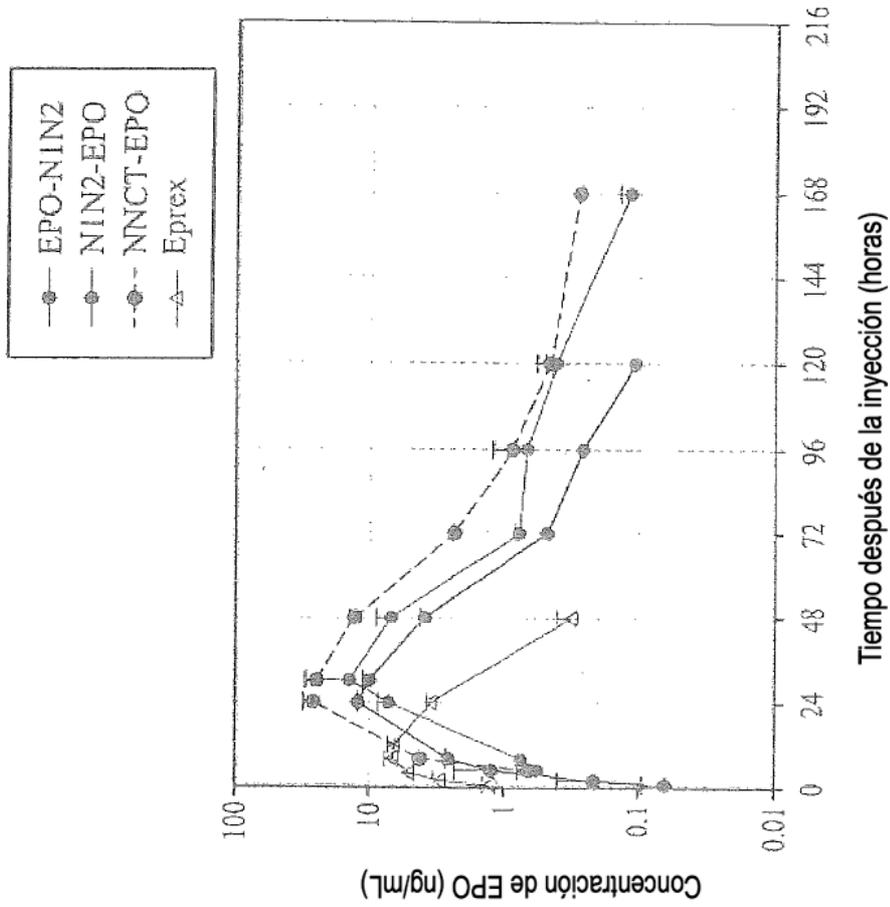


Fig. 5