

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 899**

51 Int. Cl.:

C07K 14/535 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/79 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014 PCT/KR2014/011269**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016 WO16013725**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 14898071 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3173422**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene, como ingrediente activo, la proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos o la proteína de fusión de transferrina de la misma**

30 Prioridad:

23.07.2014 KR 20140093260
13.10.2014 KR 20140137414

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2019

73 Titular/es:

SUPEX BNP CO., LTD. (100.0%)
4-204, 39, Beonnyeong-ro, Danwon-gu
Ansan-si Gyeonggi-do 425-836, KR

72 Inventor/es:

YOON, JEONG-HYEOK;
CHANG, BYUNG-HA;
JIN, BONG-SEOK;
BAE, JI YOUNG;
KIM, SOON NAM;
PARK, KYEONG SU;
PARK, YEONG KYU;
KIM, HANJO;
SEO, YOUNGJU;
JEONG, WOOSEONG y
KANG, KYUNGTAE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 735 899 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

Composición farmacéutica que contiene, como ingrediente activo, la proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos o la proteína de fusión de transferrina de la misma

Antecedentes de la invención

5 1. Campo de la invención.

La presente invención se refiere a una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

2. Descripción de la técnica relacionada

10 El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una glicoproteína que estimula la supervivencia, proliferación, diferenciación y funciones de las células progenitoras de neutrófilos y granulocitos y los neutrófilos maduros.

El G-CSF natural que ahora se usa clínicamente se llama 'Filgrastim', y es una proteína recombinante compuesta por 175 aminoácidos originados de la secuencia de aminoácidos humanos. Esta proteína recombinante se expresa en *E. coli* y no está glicosilada a diferencia del tipo natural.

15 El G-CSF se usa como un adyuvante anticáncer para la prevención de complicaciones infecciosas causadas por neutropenia acompañada por el tratamiento del cáncer mediante la estimulación de la granulopoyesis de neutrófilos. El G-CSF demuestra un efecto clínico beneficioso en pacientes con cáncer porque puede reducir los efectos secundarios de la neutropenia febril causada por la quimioterapia o la radioterapia para el tratamiento del cáncer y, por lo tanto, puede reducir la tasa de mortalidad por quimioterapia para el tratamiento del cáncer. El G-CSF aumenta el número de células progenitoras hematopoyéticas y, en consecuencia, reduce los efectos secundarios mencionados anteriormente.

También se sabe que el G-CSF estimula las células madre de la médula ósea para mover el corazón isquémico y acelera la diferenciación de las células madre en células vasculares y cardiomiocitos mediante la estimulación de la regeneración miocárdica.

25 El G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) muestra efectos farmacológicos solo por un corto tiempo. Por lo tanto, debe administrarse al menos una vez al día para tratar la enfermedad isquémica o para tratar la leucopenia causada por la quimioterapia o la radioterapia contra el cáncer. Si se administra una sustancia que tiene una semivida *in vivo* larga, los tiempos de administración necesarios para aliviar la leucopenia se reducirían y, como resultado, podría traer el efecto de prevenir las complicaciones infecciosas.

30 Cuando el polietilenglicol (PEG), el polímero químico que no se degrada *in vivo*, se fusiona con el extremo N-terminal de G-CSF, se produce una sustancia llamada 'Pegfilgrastim'. Esta sustancia se utiliza clínicamente para el tratamiento de la leucopenia. Esta sustancia tiene un aumento de la semivida *in vivo* y muestra un efecto clínico, mientras que la leucopenia continúa incluso con la administración realizada una o dos veces por semana. Sin embargo, en ese caso, una proteína se fusiona con un polímero químico por reacción química y, por lo tanto, pueden causarse problemas de eficiencia de fusión insatisfactoria y un procedimiento de purificación complicado.

La cisteína, el 17º aminoácido de G-CSF, se expone en la superficie de la proteína como un estado de unión no sulfatada. En pH neutro, la cisteína expuesta se combina con cisteína G-CSF adyacente a través de un enlace de sulfuro y como resultado pierde su actividad. Un mutante de G-CSF en el que la 17ª cisteína está sustituida con serina muestra una mayor estabilidad en pH neutro, de acuerdo con los informes anteriores.

40 La transferrina es la tercera proteína más abundante en el plasma sanguíneo, que sirve para transportar los iones de hierro presentes en la sangre a diversos tejidos. La transferrina tiene una semivida relativamente larga de 8 días, que es más corta que la de la albúmina o la inmunoglobulina G. Entra a la célula a través del receptor de la transferrina en la superficie de la célula y, una vez que suministra iones de hierro, se libera al exterior de la célula en estado de unión con el receptor. Usando estas características, la transferrina se ha usado como un compañero de fusión para aumentar la semivida en circulación al combinar las proteínas con semividas cortas de la técnica anterior.

45 El documento WO 01/51510 describe conjugados polipeptídicos que comprenden un polipéptido que presenta actividad de G-CSF y que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de G-CSF humano en al menos un residuo de aminoácido introducido y/o eliminado especificado que comprende un grupo de unión para una fracción no polipeptídica, y que tiene al menos una fracción no polipeptídica unida a un grupo de unión del polipéptido. El grupo adjunto puede, por ejemplo, puede ser un residuo de lisina, cisteína, ácido aspártico o ácido glutámico o un sitio de glicosilación, y una fracción no polipeptídica puede por ejemplo ser un polímero como el polietilenglicol o un oligosacárido.

En la presente invención, la treonina, el 116° aminoácido del G-CSF humano, se sustituyó con cisteína para inducir la unión de sulfuro con la 17ª cisteína de la secuencia de aminoácidos original de G-CSF. La unión al sulfuro hace que la estructura de la proteína sea más estable, de modo que la proteína puede ser resistente contra las proteasas, es decir, la proteína ahora tiene una resistencia a la proteasa. El intento de tener una resistencia a la proteasa a través de la construcción de tal proteína mutante es nuevo y su efecto aún no se ha informado.

No ha habido reportes sobre el uso de la proteína mutante de G-CSF, en la que el 116° aminoácido se reemplace con cisteína para que la fusión con transferrina aumente la semivida en sangre de G-CSF.

Los presentes inventores lograron fabricar una proteína de fusión de transferrina y la proteína mutante de G-CSF humano en la que el 116° aminoácido se reemplazó con cisteína y se confirmó además que la proteína de fusión había aumentado significativamente la actividad específica y la estabilidad de la sangre, en comparación con el G-CSF humano original sin fusionar, que lleva a la culminación de esta invención.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de tal manera que la cisteína es adecuada para el enlace de sulfuro con el 17° aminoácido, cisteína, de G-CSF.

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, y un uso de la misma.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica y un adyuvante anticáncer para prevenir o tratar enfermedades isquémicas o neutropenia que comprende la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de modo que la cisteína es adecuada para el enlace de sulfuro con el 17° aminoácido, cisteína, de G-CSF, como ingrediente activo.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que contiene el gen que codifica una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de modo que la cisteína sea adecuada para el enlace de sulfuro con el 17° aminoácido, cisteína, de G-CSF, y un transformante preparado insertando el vector de expresión anterior en una célula huésped.

La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación del vector de expresión que contiene el gen que codifica una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que se sustituye la 116ª treonina con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de modo que la cisteína es adecuada para el enlace de sulfuro con el aminoácido 17, cisteína, de G-CSF, y el transformante preparado insertando el vector de expresión anterior en una célula huésped.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención para uso en terapia. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención para uso en el tratamiento de una neutropenia.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención para uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad isquémica.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la invención para usar en la inhibición de la disminución en el número de neutrófilos.

La presente divulgación también describe un procedimiento para prevenir o tratar la neutropenia o la enfermedad isquémica que contiene la etapa de administrar la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en el que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, el vector de expresión o el transformante anterior a un sujeto que tiene neutropenia o enfermedad isquémica.

La presente divulgación también describe un procedimiento para inhibir la disminución en el número de neutrófilos que contienen la etapa de administrar la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un

terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, el vector de expresión o el transformante anterior a un sujeto.

- 5 Además, la presente invención proporciona un uso de la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de modo que la cisteína es adecuada para el enlace de sulfuro con el 17º aminoácido, la cisteína, del G-CSF, el vector de expresión o el transformante anterior.

Efecto ventajoso

- 10 La proteína de fusión de transferrina de la presente invención muestra un aumento significativo de la actividad específica y la estabilidad de la sangre, en comparación con el G-CSF humano convencional, y tiene una mayor eficiencia de purificación que el G-CSF PEGilado convencional caracterizado por la semivida prolongada, de modo que se puede usar ventajosamente para prevenir o tratar enfermedades isquémicas o neutropenia.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La aplicación de las realizaciones preferentes de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es un diagrama que ilustra el mapa de escisión del vector pcDNA3.1(+)/preTf.

La Figura 2 es un diagrama que ilustra el mapa de escisión del vector pcDNA3.1(+)/preTf(B).

La Figura 3 es un diagrama que ilustra el mapa de escisión del vector pcDNA3.1(+)/Tf(B).

- 20 La Figura 4 es un diagrama que ilustra el mapa de escisión del vector pcDNA3.1(+)/G-CSF(T116C)-Tf.

La Figura 5 es un diagrama que ilustra la expresión de G-CSF(T116C)-Tf en la línea celular Expi293F transfectada con plásmido G-CSF(T116C)-Tf.

La Figura 6 es un diagrama que ilustra la proteína G-CSF(T116C)-Tf separada por cromatografía en azul DEAE Affi-gel.

- 25 La Figura 7 es un diagrama que ilustra la preparación, concentración y separación de Fe³⁺ G-CSF(T116C)-Tf fusionado en forma holo (holoenzima).

La Figura 8 es un diagrama que ilustra la fuerza de unión de G-CSF(T116C)-Tf en forma de holo al receptor de transferrina.

- 30 La Figura 9 es un diagrama que ilustra la actividad de proliferación celular de las células HL-60 tratadas con G-CSF, G-CSF-Tf y G-CSF(T116C)-Tf.

La Figura 10 es un diagrama que ilustra la comparación de la resistencia de proteasa entre G-CSF y G-CSF(T116C).

La Figura 11 es un diagrama que ilustra la comparación de la semivida en plasma *in vivo* entre G-CSF-Tf y G-CSF(T116C)-Tf.

- 35 La Figura 12 es un diagrama que ilustra la comparación de la actividad fisiológica entre G-CSF y G-CSF(T116C)-Tf en la rata que tiene neutropenia.

Descripción de las realizaciones preferentes

En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle.

- 40 La presente invención proporciona una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante G-CSF del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos de G-CSF, de modo que la cisteína es adecuada para la unión de sulfuro con el 17º aminoácido, la cisteína, del G-CSF, y un uso del mismo.

- 45 El G-CSF o la transferrina utilizado en esta invención puede originarse a partir de animales, plantas o microorganismos. Es más preferiblemente el G-CSF o la transferrina originados en el hombre en el presente documento, pero también puede ser una proteína heteróloga que tenga la misma actividad que el G-CSF o la transferrina originados en humano.

La proteína anterior puede modificarse adicionalmente, tal como fosforilación, acetilación, metilación, glicosilación, etc., o puede fusionarse con otra proteína. Siempre que la función de la proteína no se pierda, dicha proteína mutante puede considerarse como la proteína antes de cualquier modificación.

5 Otro aminoácido que puede reemplazar la 116^a treonina es un aminoácido hidrófobo, que es más precisamente la cisteína que posiblemente esté unida a la 17^a cisteína de la secuencia de G-CSF a través del enlace disulfuro, pero no siempre está limitada a la misma.

El terminal donde se une la transferrina puede ser el terminal amino (extremo 5', terminal N) o el terminal carboxi (extremo 3', terminal C).

10 La proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es la proteína representada por la SEQ ID NO: 1, pero esta secuencia puede tener adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos en su secuencia, siempre que el gen que codifica el G-CSF se encuentre en la misma posición en el cromosoma y la actividad no cambie.

15 La proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) anterior tiene preferiblemente al menos 80 % de homología, más preferiblemente al menos 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID. NO: 1, pero no siempre se limita a ello.

La citada transferrina es la proteína representada por la SEQ ID. NO: 2, pero esta secuencia puede tener adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en su secuencia, siempre que el gen que codifica la transferrina se encuentre en la misma posición en el cromosoma y la actividad no cambie.

20 La proteína transferrina anterior tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácido representada por la SEQ ID. NO: 2, pero no siempre se limita a ello.

25 La proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es la proteína representada por la SEQ ID. NO: 3, pero esta secuencia puede tener adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en su secuencia siempre que el gen que codifica la transferrina se encuentre en la misma posición en el cromosoma y la actividad no cambie.

30 La proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) anterior tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID. NO: 3, pero no siempre se limita a ello.

La proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de G-CSF tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID. NO: 4, pero no siempre se limita a ello.

35 La proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante de G-CSF en la que la 116^a treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID. NO: 5, pero no siempre se limita a ello.

40 La proteína mutante de G-CSF en la que la 116^a treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, o la transferrina puede tener la sustitución de la secuencia de nucleótidos para la manipulación de genes. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción en el gen se puede sustituir con otra secuencia de nucleótidos que codifica otro aminoácido que es igual al aminoácido original pero que no causa ningún cambio en la actividad de la proteína, o una parte del gen terminal se puede eliminar, sustituir o agregar con un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción. Por ejemplo, la timina del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI del gen de la proteína, GGATCC, puede sustituirse por citosina, pero no siempre se limita a ella.

45 Dicha enzima de restricción se ejemplifica mediante EcoRI, BamHI, HindIII, KpnI, NotI, PstI, SmaI, XhoI, FokI, Alw26I, BbvI, BsrI, EarI, HphI, MboI, SfaNI, Tth111I, NaeI, NheI, *NgoMIV*, *NheI*, Eco57I, BcgI, Bpl, Bsp24I, BaeI, CjeI, EcoPI, HintIII y StyLTI, etc. Sin embargo, cualquier enzima de restricción que se use en la técnica puede usarse de acuerdo con el gen, el vector de expresión o el entorno de manipulación genética sin limitación.

55 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de la neutropenia y la enfermedad isquémica que comprende la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante de G-CSF en la que la 116^a treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF o la proteína mutante G-CSF en la que la 116^a treonina está

sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de manera que la cisteína es adecuada para la unión de sulfuro con el 17º aminoácido, cisteína, de G-CSF, como ingrediente activo, un adyuvante anticanceroso que comprende el mismo, un vector de expresión que comprende un gen que codifica dicha proteína y un transformante que comprende dicho vector de expresión.

- 5 El término 'neutropenia' como se usa en este documento indica la reducción anormal de los neutrófilos. Cuando el número de neutrófilos en sangre es inferior a 1500/μl, se clasifica como neutropenia ligera y cuando el número de neutrófilos en sangre es inferior a 1000/μl, se clasifica como neutropenia moderada. Cuando el número de neutrófilos en sangre es inferior a 500/μl, se clasifica como neutropenia grave. En un sentido amplio, la leucopenia (neucopenia) también se incluye en la neutropenia.
- 10 La "enfermedad isquémica" a la que se hace referencia aquí es causada por el daño celular causado cuando el suministro de sangre al tejido se interrumpe por hemorragia, embolia e infarto, etc., que se ejemplifica por trauma, rechazo de injerto, derrame cerebral, infracción cerebral, enfermedad renal isquémica, enfermedad pulmonar isquémica, enfermedad isquémica mediada por infección, enfermedad isquémica de las extremidades, cardiomiopatía isquémica, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca, etc.
- 15 La proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es la proteína representada por la SEQ ID NO: 1, pero esta secuencia puede tener adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos en su secuencia, siempre que el gen que codifica el G-CSF se encuentra en la misma posición en el cromosoma y la actividad no se cambia.
- 20 La proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) anterior tiene preferiblemente al menos 80 % de homología, más preferiblemente al menos 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, pero no siempre se limita a ello.
- 25 La citada transferrina es la proteína representada por la SEQ ID NO: 2, pero esta secuencia puede tener adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en su secuencia, siempre que el gen que codifica la transferrina se encuentre en la misma posición en el cromosoma y la actividad no cambie.
- La proteína transferrina anterior tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácido representada por la SEQ ID NO: 2, pero no siempre se limita a ello.
- 30 La proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es la proteína representada por la SEQ ID NO: 3, pero esta secuencia puede tener adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en su secuencia siempre que el gen que codifica la transferrina se encuentre en la misma posición en el cromosoma y la actividad no cambie.
- 35 La proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) anterior tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3, pero no siempre se limita a ello.
- 40 La proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de G-CSF tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, pero no siempre se limita a ello.
- 45 La proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante de G-CSF en la que la 116ª treonina está sustituida con otro aminoácido en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, pero esta secuencia puede tener adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos en su secuencia siempre que el gen que codifica el G-CSF o la transferrina se encuentre en la misma posición en el cromosoma y la actividad no cambie.
- 50 La proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante de G-CSF en la que la 116ª treonina está sustituida con otro aminoácido en la secuencia de aminoácidos del G-CSF tiene preferiblemente al menos un 80 % de homología, más preferiblemente al menos un 90 % de homología, y lo más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de homología con la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5, pero no siempre se limita a ello.
- 55 La proteína mutante de G-CSF en la que la 116ª treonina está sustituida con otro aminoácido en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, o la transferrina puede tener la sustitución de la secuencia de nucleótidos para la manipulación del gen. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción en el gen se puede sustituir con otra secuencia de nucleótidos que codifica otro aminoácido que es igual al aminoácido original pero que no causa ningún cambio en la actividad de la proteína, o una parte del gen terminal se puede eliminar, sustituir o agregar con un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción. Por ejemplo, la

termina del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BamHI del gen de la proteína, GGATCC, puede sustituirse por citosina, pero no siempre se limita a ella.

5 Dicha enzima de restricción se ejemplifica mediante EcoRI, BamHI, RindIII, kpnI, NotI, PstI, SmaI, XhoI, FokI, Alw26I, BbvI, BsrI, EarI, HphI, MboI, SfaNI, Tth111I, NaeI, NheI, NgoMIV, NheI, Eco57I, BcgI, Bpl, Bsp24I, BaeI, CjeI, EcoPI, HinfIII, y StyLTI, etc. Sin embargo, cualquier enzima de restricción que se use en la técnica puede usarse de acuerdo con el gen, el vector de expresión o el entorno de manipulación genética sin limitación.

10 El 'vector de expresión' de la invención es una herramienta para introducir la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína diana en una célula huésped, que incluye plásmido, cósmido, BAC y ácido nucleico del virus, etc. El vector mencionado generalmente incluye un marcador de selección, como un gen resistente a los antibióticos que puede confirmar la introducción exitosa de un gen diana en una célula huésped. El vector puede incluir además promotor, operador, codón de iniciación, codón de detención, secuencia poliadenilada, potenciador, secuencia de Kozak y secuencia de Shine-Dalgarno, etc., para la expresión de un gen diana. Si el vector es un vector de expresión replicable, puede contener un origen de replicación.

15 La célula huésped en este documento puede seleccionarse del grupo que consiste en E. coli, levadura, hongos, células vegetales y células animales, pero no siempre se limita a ellas y cualquier célula huésped que se use para la producción de una proteína recombinante en este campo puede ser aceptado.

20 La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar para administración oral o parenteral mezclando con diluyentes o excipientes de uso general, tales como cargas, diluyentes, aglutinantes, agentes humectantes, agentes desintegrantes y tensioactivos. Las formulaciones sólidas para administración oral son tabletas, píldoras, polvos, gránulos y cápsulas. Estas formulaciones sólidas se preparan mezclando con uno o más excipientes adecuados tales como almidón, carbonato de calcio, sacarosa o lactosa, gelatina, etc. Excepto los excipientes simples, se pueden usar lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, etc. Las formulaciones líquidas para administraciones orales son suspensiones, soluciones, emulsiones y jarabes, y las formulaciones mencionadas anteriormente pueden contener diversos excipientes, como agentes humectantes, edulcorantes, aromáticos y conservantes, además de diluyentes simples de uso general, como agua y parafina líquida. Las formulaciones para administración parenteral son soluciones acuosas esterilizadas, excipientes insolubles en agua, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas y supositorios. Los excipientes y suspensiones insolubles en agua pueden contener, además del compuesto o compuestos activos, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal como el aceite de oliva, éster inyectable como etilato, etc. Los supositorios pueden contener, además del compuesto o compuestos activos, witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, manteca de laurina, glicerogelatina, etc.

30 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral, y la administración parenteral incluye la aplicación externa de la piel, la inyección intrarrectal, la inyección intravenosa, la inyección intramuscular, la inyección hipodérmica, la inyección intratorácica o la inyección intracerebroventricular.

35 La dosis efectiva de la composición farmacéutica se puede determinar según el peso, la edad, el sexo, el estado de salud, la dieta, la frecuencia de administración, el procedimiento de administración, la excreción y la gravedad de la enfermedad, pero no pueden limitar la presente invención por ningún medio. Una dosis individual contiene preferiblemente la cantidad de compuesto activo que es adecuada para ser administrada en una dosis única.

40 La dosis única en el presente documento para la proteína es de 1~100 mg, preferiblemente de 3~50 mg, y más preferiblemente de 6~30 mg, que puede administrarse una vez al día o varias veces al día y puede administrarse por separado a diferentes partes.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse sola o tratarse junto con operación quirúrgica, terapia hormonal, quimioterapia y reguladores biológicos.

45 La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que la 116^a treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de modo que la cisteína es adecuada para el enlace de sulfuro con el aminoácido 17^o, cisteína, de G-CSF, un vector de expresión que contiene el gen que codifica una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) proteína mutante en la que la 116^a treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de manera que la cisteína es adecuada para la unión de sulfuro con el 17^o aminoácido, cisteína, de G-CSF, y transformante que comprende el vector de expresión.

50 La proteína en el presente documento puede obtenerse mediante síntesis química o producirse a partir de células naturales, o purificarse a partir de células huésped transfectadas mediante tecnología de ADN recombinante. La proteína obtenida puede tener una modificación adicional, como la fosforilación, la acetilación, la metilación y la glicosilación, o se puede fusionar con otra proteína, pero dicha modificación se permite siempre que la función de la proteína no cambie.

El procedimiento de preparación de la proteína utilizando tecnología de ADN recombinante se compone de los siguientes pasos:

- insertar un gen diana para la expresión en un vector de expresión;
- introducir el vector de expresión en una célula huésped; y
- 5 obtener la proteína producida mediante el cultivo de la célula huésped.

Sin embargo, la producción de la proteína no se limita a lo anterior y se puede usar cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

La etapa de obtención de la proteína se puede realizar utilizando una técnica de purificación bien conocida por los expertos en la técnica, que se ejemplifica mediante la precipitación de proteínas, centrifugación, interrupción ultrasónica, ultrafiltración, diálisis, filtración en gel, cromatografía de adsorción, cromatografía intercambio iónico, y cromatografía de afinidad.

En una realización preferente de la presente invención, se eliminó un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción del gen de la transferrina, y en su lugar se insertó un sitio de enzimas de restricción en el extremo 5' y también se insertaron un sitio de enzimas de restricción y un codón de detención en el extremo 3', dando como resultado la construcción de un plásmido. En el plásmido se insertó el gen que tiene la eliminación de un sitio de reconocimiento de enzima de restricción de la secuencia de G-CSF, dando como resultado la construcción de un plásmido en el que el gen de transferrina se fusionó con el gen de G-CSF.

En una realización preferente de la presente invención, se preparó un mutante de G-CSF reemplazando el 116º aminoácido de la secuencia de G-CSF con cisteína. Se eliminó un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción del gen y en su lugar se insertaron un sitio de enzimas de restricción y la secuencia Kozak en el extremo 5' y también se insertó un sitio de enzimas de restricción en el extremo 3', dando como resultado la construcción de un plásmido. Luego, el gen de la transferrina se fusionó con el plásmido anterior para construir un plásmido en el que el gen de la transferrina se fusionó con el gen mutante G-CSF.

En el presente documento también se describe un procedimiento para prevenir o tratar la neutropenia o enfermedad isquémica que contiene la etapa de administrar la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de modo que la cisteína es adecuada para el enlace de sulfuro con el 17º aminoácido, cisteína, de G-CSF, el vector de expresión que alberga el gen que codifica dicho proteína, o el transformante preparado insertando dicho vector de expresión en una célula huésped a un sujeto que tiene neutropenia o enfermedad isquémica.

La proteína de fusión transferrina de la presente invención muestra un aumento significativo de la actividad específica y la estabilidad de la sangre, en comparación con el G-CSF humano convencional, y tiene una mayor eficiencia de purificación que el G-CSF PEGilado convencional caracterizado por la semivida extendida, de modo que puede usarse ventajosamente para prevenir o tratar enfermedades isquémicas o neutropenia.

En el presente documento también se describe un procedimiento para inhibir la disminución en el número de neutrófilos que contiene la etapa de administrar la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, el vector de expresión o el transformante anterior a un sujeto.

La proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) de la presente invención o la proteína de fusión transferrina de la misma muestra un aumento significativo de la actividad específica y la estabilidad de la sangre, en comparación con el G-CSF humano convencional, y tiene una mayor eficiencia de purificación que el G-CSF PEGilado convencional caracterizado por una semivida prolongada, de modo que puede usarse ventajosamente para inhibir la disminución en el número de neutrófilos.

Además, la presente invención proporciona un uso de la proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en que la 116ª treonina está sustituida con cisteína en la secuencia de aminoácidos del G-CSF, de modo que la cisteína es adecuada para el enlace de sulfuro con el 17º aminoácido, la cisteína, del G-CSF, el vector de expresión o el transformante anterior.

La proteína de fusión de transferrina de la presente invención muestra un aumento significativo de la actividad específica y la estabilidad de la sangre, en comparación con el G-CSF humano convencional, y tiene una mayor eficacia de purificación que el G-CSF PEGilado convencional caracterizado por la semivida extendida, de modo que se puede usar ventajosamente como adyuvante anticáncer, y se usa para prevenir o tratar enfermedades isquémicas o neutropenia.

Las realizaciones prácticas y actualmente preferentes de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Construcción de plásmido

<1-1> Construcción del plásmido de expresión de transferrina

5 Se obtuvo ARNm total a partir de la línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2. Las células HepG2 se subcultivaron en DMEM (HyClone) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (WELGENE) y un 1 % de penicilina-estreptomicina (Gibco) en una incubadora a 37 °C y un 5 % de CO₂. Dos días después, el medio de cultivo celular HepG2 se desechó y las células se lavaron con regulador fosfato (HyClone). Se obtuvo el sedimento celular y se eliminó el medio por centrifugación. Luego, el sedimento celular se almacenó a -70 °C. Las células congeladas
10 almacenadas a -70 °C se descongelaron y se extrajo el ARNm total de las mismas usando RnaUs ToTal Tissue Premium RNA Preps (LeGene) con las condiciones estándar presentadas en el manual. Se sintetizó ADNc a partir del ARNm total obtenido utilizando oligo (dT) con el sistema de síntesis de ADNc Premium Express 1st Strand (LeGene).

15 La PCR se realizó utilizando el ADNc sintetizado como plantilla con ADN polimerasa (Phusion). Los cebadores utilizados en la reacción fueron hechos a medida en Cosmogenetech Co., Ltd. Particularmente, el sitio de la enzima de restricción NheI y la secuencia de Kozak se insertaron en el extremo 5' del gen de la transferrina y el sitio de la enzima de restricción Xho I y el codón de detención (TAA) se insertaron en el extremo 3' del gen. 10 pmol de un cebador en sentido (5'-CATGCTAGCTCCACCATGAGGCTCGCCGTGGGAGCC-3', SEQ. ID. NO: 9) y 10 pmol de un cebador antisentido (5'-AGACTCGAGTTAAGGTCTACGGAAAGTGCAG-3', SEQ ID NO: 10). Los cebadores, el
20 ADN polimerasa y el ADNc se mezclaron con un regulador, al que se agregó agua destilada para que el volumen total fuera de 50 µl. Se realizó la PCR de la siguiente manera; predesnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, fusión a 53 °C durante 30 segundos, polimerización a 72 °C durante 1 minuto, 30 ciclos desde la desnaturalización a la polimerización y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. El gen de la transferrina amplificada se transfirió a gel de agarosa al 1 % para que la electroforesis confirme el tamaño.
25 El área objetivo del gel de agarosa se cortó y el ADN se purificó utilizando el kit de purificación de ADN de fragmentos totales MEGAquick-spin™ (iNtRoN).

El gen de transferrina purificado y el plásmido pcDNA3.1(+) (Invitrogen) se digirieron con las enzimas de restricción NheI (Enzymomics) y XhoI (Enzymomics). Se agregaron 10 unidades de la enzima de restricción y el regulador 2 (Tris-HCl 10 mM, pH 7.9, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, 100 µg/ml de BSA), seguido de reacción a 37 °C
30 durante 2~3 horas. Una vez completada la reacción, se confirmó el tamaño del gen mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El área objetivo del gel de agarosa se cortó y el ADN se purificó utilizando el kit de purificación de ADN de fragmentos totales MEGAquick-spin™ (iNtRoN).

El gen de transferrina purificado y el vector pcDNA3.1(+) se hicieron reaccionar con ADN ligasa T4 (Takara) a 16 °C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, el vector se insertó en E. coli DH10B, que se distribuyó en una
35 placa de agar que contenía ampicilina, seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas. Luego, se seleccionó la colonia de E. coli.

Para investigar si el gen de la transferrina se insertó con éxito o no en el plásmido pcDNA3.1(+), la PCR se realizó utilizando ADN polimerasa. La colonia de E. coli seleccionada se diluyó en agua, que se usó como plantilla, seguida de PCR con el cebador en sentido (5'-CATGCTAGCTCCACCATGAGGCTCGCCGTGGGAGCC-3', SEQ. ID. NO: 9) y el cebador antisentido (5'-AGACTCGAGTTAAGGTCTACGGAAAGTGCAG-3', SEQ ID NO: 10) utilizado para la
40 amplificación del gen de la transferrina anterior. La PCR se realizó de la siguiente manera; predesnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, fusión a 53 °C durante 30 segundos, polimerización a 72 °C durante 1 minuto, 30 ciclos desde la desnaturalización a la polimerización y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Al finalizar la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para confirmar el gen.
45

La colonia confirmada de E. coli se inoculó en un medio líquido LB (1 % de triptón, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl), seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas en una incubadora de agitación. La E. coli cultivada se centrifugó para separar el sobrenadante y el sedimento celular. El ADN del plasma se purificó del sedimento celular utilizando Exprep™ Plasmid SV, mini (GeneAll). La secuenciación del plásmido purificado se realizó por
50 Cosmogenetech Co., Ltd. El plásmido de expresión de transferrina preparado se denominó en esta invención 'pcDNA3.1(+)/preTf (SEQ. ID. NO: 6)' (Figura 1).

Para usar el sitio de la enzima de restricción BamHI para la construcción de un plásmido, el sitio de BamHI en el gen de la transferrina se mutó mediante mutagénesis directa para eliminar el sitio de la enzima de restricción de BamHI. Para eliminar el sitio de la enzima de restricción BamHI del gen de la transferrina, la timina (T) se reemplazó con
55 citosina (C), pero la secuencia de aminoácidos se mantuvo con ácido aspártico. Para reemplazar el sitio de la enzima de restricción BamHI, GGATCC, con la secuencia GGACCC, el cebador en sentido (5'-CTATGGGTCAAAGAGGACCCACAGACTTTCTATT-3', SEQ ID NO 11: y se usó el cebador antisentido (5'-AATAGAAAGTCTGTGGGTCTCTTTTGACCCATAG-3', SEQ. ID. NO: 12) hecho a medida en Cosmogenetech Co.,

Ltd. La mutagénesis directa al sitio se realizó utilizando el plásmido pcDNA3. (+)/preTf preparado como plantilla utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Muta-direct (iNtRON) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez completada la reacción, el gen se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. La colonia de E. coli confirmada se inoculó en un medio líquido LB que contenía ampicilina, seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas en una incubadora de agitación. La E. coli cultivada se centrifugó para separar el sobrenadante y el sedimento celular. El ADN del plasma se purificó a partir del sedimento celular utilizando un kit de extracción de plásmidos (GeneAll). La sustitución del ácido nucleico del sitio de la enzima de restricción BamHI en el gen de la transferrina se confirmó mediante secuenciación. El plásmido preparado se denominó en esta invención 'pcDNA3.1(+)/preTf(B) (SEQ ID NO: 7)' (Figura 2).

La transferrina es una proteína secretora que contiene un péptido de señalización para ayudar al transporte de una proteína sintetizada en el terminal N a la membrana celular. La transferrina se compone de la secuencia de aminoácidos 'MRLAVGALLVCAVLGLCLA (SEQ ID NO: 13)'. Para insertar un gen del factor estimulante de la leucocitopoyesis humana en el extremo 5' del gen de la transferrina, se eliminó el péptido de señalización de la transferrina y se colocó la enzima de restricción BamHI en el extremo 5', lo que dio como resultado la construcción de un plásmido. En el extremo 3' se insertaron XhoI y el codón de detención (TAA). La PCR se realizó utilizando pcDNA3.1(+)/preTf(B) como plantilla en presencia de ADN polimerasa. El sitio de la enzima de restricción XhoI y el codón de detención (TAA) se insertaron en el extremo 3' del gen. La PCR se realizó utilizando pcDNA3.1(+)/preTf(B) como plantilla con ADN polimerasa. Los cebadores utilizados en la reacción fueron hechos a medida en Cosmogenetech Co., Ltd. Se utilizaron 10 pmol de un cebador en sentido (5'-CTCGGATCCGTCCTGATAAACTGTGAGATG-3', SEQ ID NO: 14) y 10 pmol de un cebador antisentido (5'-AGACTCGAGTTAAGGTCTACGGAAAGTGCAG-3', SEQ ID NO: 10). Los cebadores, el ADN polimerasa y la plantilla se mezclaron con regulador, al que se agregó agua destilada para hacer que el volumen total fuera de 50 µl. La PCR se realizó de la siguiente manera; predesnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, fusión a 53 °C durante 30 segundos, polimerización a 72 °C durante 1 minuto, 30 ciclos desde la desnaturalización a la polimerización y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. El gen de la transferrina amplificada se transfirió a gel de agarosa al 1 % para que la electroforesis confirmara el tamaño. El área objetivo del gel de agarosa se cortó y el ADN se purificó utilizando el kit de purificación de ADN de fragmentos totales MEGAquick-spin™ (iNtRoN). El gen de transferrina purificado y el plásmido pcDNA3.1(+) se digirieron con las enzimas de restricción BamHI (Enzymomics) y XhoI (Enzymomics). Se agregaron 10 unidades de la enzima de restricción y el regulador 2 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, 100 µg/ml de BSA), seguido de reacción a 37 °C durante 2~3 horas. Una vez completada la reacción, se confirmó el tamaño del gen mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El área objetivo del gel de agarosa se cortó y el ADN se purificó utilizando el kit de purificación de ADN de fragmentos totales MEGAquick-spin™ (iNtRoN). El gen de transferrina purificado y el vector pcDNA3.1(+) procedieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % nuevamente, seguido de cuantificación de ADN. El gen de la transferrina y el vector pcDNA3.1(+) se hicieron reaccionar con ADN ligasa T4 (Takara) a 16 °C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, el vector se insertó en E. coli DH10B, que se distribuyó en una placa de agar que contenía ampicilina, seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas. Luego, se seleccionó la colonia de E. coli. Para investigar si el gen de la transferrina se insertó con éxito o no en el plásmido pcDNA3.1(+), se realizó la PCR. La colonia de E. coli seleccionada se diluyó en agua, que se usó como plantilla, seguido de PCR con el cebador en sentido (5'-CTCGGATCCGTCCTGATAAACTGTGAGATG-3', SEQ ID NO: 14) y el cebador antisentido (5'-AGACTCGAGTTAAGGTCTACGGAAAGTGCAG-3', SEQ ID NO: 10) utilizado para la amplificación del gen de la transferrina anterior. La PCR se realizó de la siguiente manera; predesnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, fusión a 53 °C durante 30 segundos, polimerización a 72 °C durante 1 minuto, 30 ciclos desde la desnaturalización a la polimerización y extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Al finalizar la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para confirmar el gen. La colonia de E. coli confirmada se inoculó en un medio líquido LB (1 % de triptón, 0,5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl), seguido de cultivo a 37 °C durante 16 horas en una incubadora de agitación. La E. coli cultivada se centrifugó para separar el sobrenadante y el sedimento celular. El ADN del plasma se purificó del sedimento celular utilizando Exprep™ Plasmid SV, mini (GeneAll). La inserción del gen de la transferrina sin péptido de señalización se confirmó mediante secuenciación. El plásmido preparado se denominó en esta invención 'pcDNA3.1(+)/Tf(B) (SEQ ID. NO: 8)' (Figura 3).

<1-2> Construcción del plásmido de expresión G-CSF-Tf

Para eliminar el sitio de la enzima de restricción BamHI de pcDNA6/G-CSF, el plásmido pcDNA6/G-CSF se trató con 20 unidades de BamHI (Enzymomics), seguido de reacción a 37 °C durante 3 horas. El plásmido reaccionado (45 ng) se amplificó por PCR con 10 pmol de un cebador sentido (5'-CATGCTAGCTCCACCA TGGCTGGACCTGCCACCCAG-3', SEQ ID NO: 15) y un cebador antisentido (5'-CATGGATCCGGGCTGGGCAAGGTGGCG-3', SEQ ID. NO: 16). Como resultado, se preparó un fragmento del gen G-CSF que tiene un sitio de enzima de restricción NheI y una secuencia de Kozak en el sitio del extremo 5' y un sitio de enzima de restricción BamHI en el extremo 3'. 1 µg del fragmento de gen de G-CSF preparado y 365 ng de plásmido pcDNA3.1(+)/Tf(B) se hicieron reaccionar con 10 unidades de enzima de restricción NheI y 20 unidades de enzima de restricción BamHI respectivamente a 37 °C para 4 horas. Se realizó la electroforesis de ADN en gel de agarosa (0,5x TAE, 1 % de agarosa). Para construir pcDNA3.1(+)/G-CSF-Tf, el pcDNA3.1(+)/Tf(B) plásmido purificado y el fragmento del gen G-CSF se mezclaron a la relación molar de 1:3, que reaccionó con 350 U de ADN

ligasa T4 a 25 °C durante 1 hora. A continuación, se transfectó E. coli DH5α con el producto de reacción. Se seleccionaron colonias que mostraban resistencia contra la ampicilina. Se realizó una PCR de colonias para confirmar la construcción del plásmido pcDNA3.1(+)/G-CSF-Tf. Particularmente, las colonias seleccionadas de E. coli DH5α transfectadas se amplificaron por PCR de colonias con 10 pmol del cebador en sentido (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SEQ ID NO: 17) y el cebador antisentido (5'-AATAGAAAGTCTGTGGGTCCTCCTCCTCC-3', SEQ ID NO: 18). El tamaño del producto amplificado se confirmó en gel de agarosa (0,5X TAE, agarosa al 1 %). La colonia confirmada se inoculó en un medio líquido LB (50 mg de triptón, 25 mg de extracto de levadura y 50 mg de cloruro de sodio por 5 ml) que contenían ampicilina (100 µg/ml), seguido de un cultivo durante 15 horas. pcDNA3.1(+)/G-CSF-Tf se extrajo utilizando un kit de extracción de plásmidos. La construcción exitosa de pcDNA3.1(+)/G-CSF-Tf se confirmó mediante secuenciación.

<1-3> Construcción del plásmido de expresión G-CSF(T116C) y G-CSF(T116C)-Tf

Se mezclaron 10 pmol del cebador en sentido (5'-GCCGACTTTGCCACCTGCATCTGGCAGCAGAT-3', SEQ. ID. NO: 19) y el cebador antisentido (5'-ATCTGCTGCCAGATGCAGGGGGCAAAGTCGGC-3', SEQ ID NO: 20) pET21a(+)/G-CSF, seguido de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó de la misma manera que se describe en el Ejemplo <1-1> para construir G-CSF (T116C). El plásmido resultante se denominó en esta invención 'pET21a(+)/G-CSF (T116C)'.

El tamaño de pET21a(+)/G-CSF(T116C) se confirmó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa (0,5X TAE, agarosa al 1 %). El área objetivo del gel de agarosa se cortó y el ADN se purificó utilizando un kit de purificación de gel (Cosmogenetech). E. coli DH10B se transfectó con el pET21a(+)/G-CSF purificado (T116C). Se seleccionaron colonias que mostraban resistencia contra la ampicilina. La colonia seleccionada se inoculó en un medio líquido LB (50 mg de triptón, 25 mg de extracto de levadura y 50 mg de cloruro de sodio por 5 ml) que contenían ampicilina (100 µg/ml), seguido de un cultivo durante 15 horas. Se extrajo pET21a(+)/G-CSF(T116C) usando un kit de extracción de plásmido. Se realizó la secuenciación y, como resultado, se confirmó la sustitución exitosa de la secuencia de nucleótidos.

En primer lugar, el cebador en sentido (5'-GCCGACTTTGCCACCTGCATCTGGCAGCAGAT-3', SEQ. ID. NO: 19) y el cebador antisentido (5'-ATCTGCTGCCAGATGCAGGGGGCAAAGTCGGC-3', SEQ ID: 20) se disolvieron respectivamente a la concentración de 10 pmol/µl. Se tomaron 10 pmol de cada cebador para la PCR con 100 ng del gen G-CSF (100 ng) insertado en pcDNA6. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó de la misma manera que se describe en el Ejemplo <1-1> para obtener el gen G-CSF(T116C). El plásmido obtenido se nombró en esta invención 'pcDNA6/G-CSF(T116C)'.

El tamaño de pcDNA6/G-CSF(T116C) se confirmó mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa (0,5X TAE, agarosa al 1 %). El área objetivo del gel de agarosa se cortó y el ADN se purificó utilizando un kit de purificación de gel (Cosmogenetech). E. coli DH10B se transfectó con el pcDNA6/G-CSF purificado (T116C). Se seleccionaron colonias que mostraban resistencia contra la ampicilina. La colonia seleccionada se inoculó en un medio líquido LB (50 mg de triptón, 25 mg de extracto de levadura y 50 mg de cloruro de sodio por 5 ml) que contenían ampicilina (100 µg/ml), seguido de un cultivo durante 15 horas. Se extrajo el pcDNA6/G-CSF(T116C) utilizando un kit de extracción de plásmidos. Se realizó la secuenciación y, como resultado, se confirmó la sustitución exitosa de la secuencia de nucleótidos. Para eliminar el sitio de la enzima de restricción BamHI de pcDNA6/G-CSF(T116C), se trató 1 µg de plásmido de pcDNA6/G-CSF(T116C) con 20 unidades de BamHI (Enzymomics), seguido de reacción a 37 °C durante 3 horas. El plásmido reaccionado (45 ng) se amplificó por PCR con 10 pmol de un cebador sentido (5'-CATGCTAGCTCCACCA TGGCTGGACCTGCCACCCAG-3', SEQ ID NO: 15) y un cebador antisentido (5'-CATGGATCCGGGCTGGGCAAGGTGGCG-3', SEQ ID NO: 16). Como resultado, se preparó un fragmento de ADN G-CSF(T116C) que tiene un sitio de enzima de restricción Nhe I y una secuencia de Kozak en el sitio del extremo 5' y un sitio de enzima de restricción BamHI en el extremo 3'. 1 µg del fragmento de ADN de G-CSF(T116C) preparado y 365 ng de plásmido pcDNA3.1(+)/Tf(B) se hicieron reaccionar con 10 unidades de enzima de restricción NheI y 20 unidades de enzima de restricción BamHI respectivamente a 37 °C durante 4 horas. Se realizó la electroforesis de ADN en gel de agarosa (0,5x TAE, 1 % de agarosa), seguida de purificación utilizando un kit de extracción en gel. Para construir pcDNA3.1(+)/G-CSF(T116C)-Tf, el plásmido pcDNA3.1(+)/Tf(B) purificado y el fragmento de ADN G-CSF(T116C) se mezclaron en la relación molar de 1:3, que se hizo reaccionar con 350 U de ADN ligasa T4 a 25 °C durante 1 hora. A continuación, se transfectó E. coli DH5α con el producto de reacción. Se seleccionaron colonias que mostraban resistencia contra la ampicilina. Se realizó una PCR de colonias para confirmar la construcción del plásmido pcDNA3.1(+)/G-CSF(T116C)-Tf. Particularmente, las colonias seleccionadas de E. coli DH5α transfectadas se amplificaron por PCR de colonias con 10 pmol del cebador en sentido (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SEQ ID NO: 17) y el cebador antisentido (5'-AATAGAAAGTCTGTGGGTCCTCCTCCTCC-3', SEQ ID NO: 18). El tamaño del producto amplificado se confirmó en gel de agarosa (0,5X TAE, agarosa al 1 %). La colonia confirmada se inoculó en un medio líquido LB (50 mg de triptón, 25 mg de extracto de levadura y 50 mg de cloruro de sodio por 5 ml) que contenían ampicilina (100 µg/ml), seguido de un cultivo durante 15 horas. Se extrajo pcDNA3.1(+)/G-CSF(T116C)-Tf utilizando un kit de extracción de plásmidos. La construcción exitosa de pcDNA3.1(+)/G-CSF(T116C)-Tf (SEQ ID NO: 21) se confirmó mediante secuenciación.

60 Ejemplo 2: Expresión de proteínas a través de transfección transitoria

<2-1> Expresión de G-CSF(T116C)

Se inoculó 1 µl de plásmido pET21a(+)/G-CSF(T116C) en 20 µl de Rosetta2 (DE3), la cepa de expresión, seguido de reacción a 42°C durante 90 segundos para la transfección. La cepa de expresión transfectada se extendió sobre una placa LB que contenía ampicilina (50 µg/ml), seguido de cultivo a 37°C durante 15 horas para obtener colonias. Las colonias se inocularon en 100 ml de medio LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml), seguido de cultivo a 37°C durante 15 horas. Se inocularon 20 ml de la cepa cultivada en 1 L de medio LB que contenía ampicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml), seguido de cultivo con agitación a 37 °C durante 4 horas hasta que la OD₆₀₀ alcanzó 0,8. Se añadió 1 mM de IPTG, seguido de agitación del cultivo a 37°C durante 4 horas. La centrifugación se realizó a 6000 rpm durante 15 minutos para separar el sobrenadante y el precipitado respectivamente. La expresión de la proteína como un cuerpo de inclusión se confirmó mediante SDS-PAGE. <2-2> Expresión de G-CSF(T116C)-Tf

Las proteínas utilizadas en esta invención se expresaron mediante secreción extracelular utilizando Expi293F™ (Gibco), la línea celular de cáncer de riñón embrionario humano modificada para el cultivo en suspensión. Las células Expi293F™ incluidas en el kit del sistema de expresión Expi293F™ (Gibco) se descongelaron primero, se inocularon en un matraz esterilizado de 125 ml (Thermo) que contenía 30 ml de medio sin suero para el cultivo de células animales (Gibco), seguido de un cultivo con agitación 125 rpm en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂.

La densidad de la línea celular Expi293F™ se mantuvo en 3~5x10⁶ células/ml. El subcultivo se realizó cada 3~4 días. Una vez estabilizadas, las células se inocularon en medio sin suero a la densidad de 2x10⁶ células/ml para la transfección, seguido de agitación del cultivo durante 24 horas. Justo antes de la transfección, la densidad celular se ajustó a 2x10⁶ células/ml y la tasa de supervivencia celular se confirmó al menos el 90 % antes del siguiente experimento.

Se prepararon 22,5 µg de ADN del plasma de G-CSF-Tf y G-CSF(T116C)-Tf y se diluyeron en Opti-MEM (Gibco). También se diluyeron 45 µl de reactivo 45 de ExpiFectamine™ 293 en Opti-MEM®, que se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. El plásmido y la mezcla de reactivos ExpiFectamine™ 293 se mezclaron bien, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, la mezcla se distribuyó uniformemente a las células. 16~18 horas después de la transfección, ExpiFectamine™ 293 Transfección Enhancers 1 y 2 (Gibco) se añadieron a la misma con el fin de aumentar la expresión de la proteína, seguido de cultivo adicional durante 32 horas bajo la misma condición cultivo con agitación anteriormente. El fluido de cultivo celular obtenido se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos y, como resultado, se obtuvo el sobrenadante.

Para confirmar la expresión de la proteína, el sobrenadante se mezcló con un colorante de carga 5x (Biosesang), que se hirvió a 95 °C durante 20 minutos. La mezcla se cargó en 10 % SDS-PAGE, seguido por electroforesis a 160 V durante 1 hora. Una vez completada la electroforesis, la proteína en el gel se transfirió a la membrana de transferencia de inmobilon-P PVDF (Millipore). La membrana se hizo reaccionar en leche desnatada al 5 % a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar la membrana con el regulador de lavado (regulador fosfato que contiene Tween 20 al 0,05 %), se le añadió un anticuerpo transferrina (2000x, Santa Cruz), seguido de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la membrana con regulador de lavado nuevamente, se agregó un anticuerpo conjugado con peróxidos de rábano picante (10000x, Santa Cruz), seguido de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez completada la reacción antígeno-anticuerpo, la membrana se lavó con regulador de lavado y se indujo el desarrollo del color mediante el uso del sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Thermo). El peso molecular de G-CSF-Tf y G-CSF(T116C)-Tf fue de 105,7 kDa, lo que sugiere que la proteína se expresó normalmente (Figura 5).

Ejemplo 3: Purificación de proteínas<3-1> Purificación de G-CSF(T116C)

Para purificar el cuerpo de inclusión, las células se disolvieron en un regulador de lisis (Tris-Cl 50 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, PMSF 1 mM), seguido de lisis celular utilizando un ultrasonicador (tiempo de lisis: 5 minutos, ultrasonicación: 30 segundos, reposo: 40 segundos). La centrifugación se realizó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para eliminar el sobrenadante. Luego, el precipitado se disolvió en un regulador de lavado (Tris-Cl 50 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, Triptón al 0,3 %) y se sometió a lisis utilizando un ultrasonicador (tiempo de lisis: 5 minutos, ultrasonicación: 30 segundos, en espera: 40 segundos). La centrifugación se realizó de nuevo a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para eliminar el sobrenadante. El precipitado se disolvió en un regulador de lavado (Tris-Cl 50 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, NaCl 1 M) y se sometió a lisis utilizando un ultrasonicador (tiempo de lisis: 5 minutos, ultrasonicación: 30 segundos, en espera: 40 segundos). La centrifugación se realizó de nuevo a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para eliminar el sobrenadante. El cuerpo de inclusión lavado se disolvió en un regulador de solubilización (urea 8 M, Tris-Cl 50 mM, pH 8,0). Se cargaron 10 ml de la muestra de proteína disuelta en un tubo de diálisis, que se dejó en 2 L de un regulador de diálisis (Tris-Cl 50 mM, pH 8,0, Tween20 al 0,1 %) a 4 °C durante 16 horas para el replegamiento. Se cargó ácido acético 2 M en la muestra de reacción y se ajustó el pH a 4,5, seguido de centrifugación a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La columna de desalinización (17-5087-05) conectada a Hiprep 26/10 AKTA Pprime más FPLC se llenó con un regulador de desalinización (acetato de Na 25 mM, pH 4,5,

sacarosa al 5 %, Tween20 al 0,004 %). Luego, se realizó el intercambio de regulador pasando el sobrenadante separado por centrifugación a través de la columna anterior.

<3-2> Cuantificación de G-CSF(T116C)

5 El G-CSF(T116C) purificado se cuantificó usando tinción con plata. La curva de cuantificación estándar se obtuvo utilizando Grasin (menos de 30 ng/pozo SDS-PAGE), el material estándar de G-CSF. La cantidad desconocida de cada muestra se comparó con la curva de cuantificación estándar para cuantificar la proteína.

<3-3> Cuantificación de G-CSF(T116C)-Tf

10 Se dializaron 30 ml del sobrenadante que contenía G-CSF-Tf o G-CSF(T116C)-Tf en 4 L de regulador de fosfato de potasio 20 mM (pH 7,5), seguido de un intercambio de regulador. La columna DEAE Affi-gel Blue se llenó con G-CSF-Tf o G-CSF(T116C)-Tf incluido en el regulador de fosfato de potasio a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Luego, se vertió fosfato de potasio 72 mM a través de un gradiente escalonado y, por lo tanto, las proteínas absorbidas en la resina se separaron de otras proteínas incluidas en el fluido de cultivo (Figura 6).

<3-4> Preparación de la forma fundida de hierro (Fe³⁺)

15 La preparación de la forma holo de G-CSF(T116C)-Tf se basó en [Zhang et al. BMC Biotechnology 2012, 12:92]. El G-CSF-Tf o G-CSF(T116C)-Tf purificados se trató con el citrato de amonio férrico equivalente, seguido de la reacción a 37 °C durante 2 horas. La mezcla se dializó en 2 L de solución salina tamponada con fosfato a 4°C durante 15 horas, durante las cuales se intercambió el regulador. La muestra se concentró 10 veces utilizando un concentrador (Millipore) (Figura 7).

<3-5> Cuantificación de proteínas

20 La proteína purificada se cuantificó por inmunotransferencia Western usando un anticuerpo de transferrina. La transferrina medida se cargó en SDS-PAGE al 10 % a las concentraciones de 15 ng, 20 ng, 25 ng y 30 ng por pozo. Otra proteína purificada cuya concentración no se determinó se cargó en otro pozo, seguido de electroforesis. Se realizó una inmunotransferencia Western para cuantificar las muestras de proteína comparando la proteína purificada con la curva estándar de transferrina.

25 Ejemplo 4: Investigación de la fuerza de unión con el receptor de transferrina

Una vez que la transferrina se une al receptor de la transferrina expresado en la superficie celular, ingresa a la célula a través de la endocitosis. Después de liberar el hierro, el complejo receptor-transferrina se mueve de nuevo a la superficie celular y luego se secreta en la sangre. La transferrina repite el proceso anterior, es decir, el metabolismo de reciclaje *in vivo*, mediante el cual suministra el hierro y evita que se descomponga en el lisosoma intracelular, lo que resulta en el aumento de la semivida. Si una proteína diana que tiene una semivida corta se conjuga con la transferrina, la proteína experimenta la acción del metabolismo de reciclaje *in vivo* de la transferrina junto con la transferrina. Como resultado, la proteína diana también puede evitar su descomposición *in vivo*. Por lo tanto, la proteína de fusión en la que el G-CSF está conjugado con la transferrina debe mantener la fuerza de unión al receptor de la transferrina para evitar la degradación *in vivo*.

35 Para investigar la fuerza de unión de las proteínas de la invención al receptor de transferrina de superficie extracelular (TfR), se utilizó la línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 que demuestra una alta expresión de TfR en la superficie celular para el siguiente experimento. Las células HepG2 se inocularon en una placa de 96 pozos a la densidad de 5x10⁵ células/pozo, seguido de cultivo durante 24 horas. Las células HepG2 unidas a la placa se lavaron con regulador fosfato, al que se añadió DMEM sin suero (HyClone) suplementado con 1 mg/ml de BSA (albúmina de suero bovino). La mezcla permaneció en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 30 minutos para eliminar la transferrina endógena de las células. Las células se lavaron con regulador fosfato de nuevo y luego se agregaron la muestra de prueba y la transferrina humana Fluor® 647 (Life Technologies) marcada con fluorescencia al DMEM sin suero complementado con 1 mg/ml de BSA en las concentraciones de 133 nM y 5 µg/ml respectivamente. La mezcla anterior se trató con las células HepG2 preparadas anteriormente, que se mantuvieron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 30 minutos. La muestra de proteína restante en el medio se lavó con regulador de fosfato frío. El receptor de transferrina conjugado de fluorescencia-transferrina se cuantificó por fluorometría. Para la fluorometría, se proporcionó una fuente de luz a 650 nm y se midió la intensidad de fluorescencia a 668 nm.

50 La fuerza de unión al receptor de transferrina de la forma holo de G-CSF(T116C)-Tf preparada en el Ejemplo <3-4> se muestra en la Figura 8. Como resultado, como se muestra en la Figura 8, la fuerza de unión del receptor de transferrina de la proteína de fusión G-CSF-Tf o G-CSF(T116C)-Tf fue similar a la de la holo-transferrina humana natural (SIGMA). Este resultado sugiere que la proteína de fusión G-CSF-Tf o G-CSF(T116C)-Tf puede tener una semivida mayor al experimentar el reciclado *in vivo* debido a la conjugación con el receptor de transferrina, como la transferrina humana.

55 Ejemplo 5: Actividad biológica de la proteína mutante G-CSF

Para medir la actividad biológica de la proteína mutante G-CSF-Tf purificada, se midió la proliferación de células HL-60 diferenciadas por DMSO al 1,25 %.

<5-1> Preparación y tratamiento de la línea celular HL-60 derivada de la médula ósea humana

5 La línea celular derivada de médula ósea humana HL-60 utilizada en esta divulgación fue distribuida por la Korean Collection for Type Culture (KCTC), Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB). La línea celular se cultivó en RPMI-1640 que contenía FBS al 10 % en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂. El medio se reemplazó por uno nuevo cada 2~3 días. Las células no dependían del anclaje. Los reactivos para el cultivo celular se adquirieron de HyClone.

<5-2> Actividad de proliferación celular de la proteína mutante G-CSF

10 Se contó el número de células y se ajustó la densidad para que fuera de 2×10^5 células/ml. Las células se trataron con el inductor de diferenciación DMSO (dimetilsulfóxido, grado de cultivo, SIGMA) a la concentración final de 1,25 % (v/v), seguido de cultivo durante 3 días para inducir la diferenciación en granulocitos. Antes de agregar la muestra de prueba, las células se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron con regulador fosfato (D-PBS). Las células se distribuyeron en una placa de 96 pozos (Corning), 100 µL por cada pozo, a la densidad de 4×10^4 células/pozo.

15 Los controles G-CSF humano PEGilado (GenScript) y G-CSF natural (GenScript), y las muestras de prueba G-CSF-Tf, G-CSF(T116C)-Tf y G-CSF(T116C) se diluyeron en regulador desalador (fosfato sódico 5 mM, sacarosa al 5 %, Tween-20 al 0,004 %), que se agregaron a cada pozo que contenía células HL-60 diferenciadas, seguido de cultivo en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 72 horas. Las concentraciones finales de cada muestra fueron 300, 200, 100, 30, 15, 3, 0,3 y 0,03 ng/ml.

20 Para investigar el nivel de proliferación celular mediante la administración de las muestras de prueba, se agregaron 15 µL de solución CellTiter96™ (Promega) a cada pozo, seguido de cultivo durante 4 horas. Se añadieron 100 µL de solución de solubilización/parada a cada pozo para terminar la reacción. La OD₅₇₀ de cada pozo se midió con un lector ELISA (TECAN). Se contó y analizó el aumento del número de células. La actividad de proliferación celular de esas muestras de prueba se presentó como la concentración equivalente a la de G-CSF.

25 La actividad de proliferación celular de G-CSF, PEG.G-CSF, G-CSF(T116C), G-CSF-Tf y G-CSF(T116C)-Tf se muestra en la Figura 9. Como se muestra en la Figura 9, la actividad de proliferación celular de G-CSF(T116C) fue menor que la del G-CSF natural, pero fue similar a la del G-CSF PEGilado. Mientras tanto, la actividad de proliferación celular de la proteína de fusión G-CSF(T116C)-Tf en la que la transferrina se fusiona con una proteína mutante G-CSF(T116C) aumentó significativamente, en comparación con la de G-CSF(T116C) y también fue superior a la del G-CSF PEGilado. Por lo tanto, dado que el G-CSF(T116C)-Tf muestra una mayor actividad de proliferación celular que la del G-CSF PEGilado comercial, se espera que sea un candidato prometedor como agente para el tratamiento, en particular utilizando G-CSF.

Ejemplo 6: Resistencia a las proteasas sanguíneas

35 Para medir la resistencia contra las proteasas sanguíneas de la proteína mutante G-CSF(T116C) de la presente invención, se hizo reaccionar la proteína con suero humano y luego se midió la cantidad de G-CSF restante en el suero durante un tiempo designado.

<6-1> Reacción de G-CSF con suero humano

40 Se investigó si la estabilidad de la proteína mutante de G-CSF de la presente invención estaba asociada estrechamente con la resistencia contra la proteasa de la sangre. En particular, el suero humano (SIGMA) se inactivó a 56 °C durante 30 minutos. Se añadieron 2,8 µg/ml de la muestra de proteína a la relación de 24:1 (v/v), seguido de reacción a 37°C. Las horas de reacción fueron 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 horas. La mezcla completa de inhibidores de la proteasa (Roche) se trató en la muestra a cada hora designada, que luego se almacenó a -70 °C al finalizar la reacción.

<6-2> Medición de G-CSF residual

45 Después de descongelar la muestra, la cantidad de G-CSF restante después de la reacción con suero humano se cuantificó mediante un ELISA de sándwich (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Se preparó la curva de calibración de la absorbancia según la concentración de proteína a la solución estándar y se realizó un análisis de regresión para determinar el contenido de proteína G-CSF en la solución de prueba.

50 Se preparó la placa de microtitulación de alta unión a proteínas (Corning) recubierta con un anticuerpo policlonal de conejo anti-G-CSF (KOMA BIOTECH) a la concentración de aproximadamente 2 µg/ml. Se utilizó regulador de fosfato 1X que contenía sal de sodio de caseína al 1 % como regulador de bloqueo. La solución estándar y la solución de prueba se mezclaron con un regulador (regulador de bloqueo diluido 10x). La muestra de proteína y los reagentes se distribuyeron en 100 µL por cada pozo. La placa se trató con un regulador de lavado (1X PBS, Tween-20

al 0,05 %) tres veces (300 µl/pozo) para lavar las muestras no reaccionadas. La muestra de proteína y el anticuerpo de detección (anticuerpo policlonal de conejo anti-G-CSF, KOMA BIOTECH) se trataron por etapas a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas, seguido de reacción con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Pierce) a 37 °C durante 30 minutos. Se trató TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Pierce), que se mantuvo a temperatura ambiente durante aproximadamente 7~10 minutos y luego se terminó el desarrollo de color con ácido sulfúrico 2M. Luego, se midió la OD₄₅₀ con un lector de microplacas (TECAN).

La absorbancia se convirtió en concentración basada en la curva de calibración de la concentración de proteína-absorbancia en la solución estándar. La curva estándar se realizó utilizando el programa Excel. Se calculó la diferencia entre el valor medio de la absorbancia correspondiente a cada solución estándar de G-CSF y el valor de absorbancia del pozo tratado con el regulador solo. Para la determinación de la concentración de la solución de prueba, solo cuando el valor de absorbancia de cada muestra estaba en el rango de la curva de calibración de la solución estándar, se tomó como válida. El criterio de valor absoluto (|R|) calculado mediante el uso del coeficiente de correlación (R²) como raíz ($\sqrt{\quad}$) se estableció en al menos 0,98. La cantidad de la proteína G-CSF restante (% G-CSF) se expresó considerando la concentración de G-CSF (pg/ml) en el punto de tiempo de reacción de 0 h como 100 %.

La cantidad (%) de G-CSF restante y G-CSF(T116C) por período de tiempo se muestra en la Figura 10. El porcentaje de G-CSF(T116C) restante fue aproximadamente un 30 % más alto que el del G-CSF natural desde las 15 horas después de que la reacción comenzó. Se confirmó que el enlace disulfuro entre Cys116 y Cys17 fue útil para el aumento de la resistencia de la proteína contra la proteasa de la sangre.

20 **Ejemplo 7: Medición de la semivida *in vivo* de proteínas mutantes de G-CSF**

Para investigar la semivida *in vivo* de la proteína mutante G-CSF y la proteína de fusión transferrina de la invención, las proteínas se administraron a ratones y luego se midió el nivel de G-CSF en el suero de rata. La mencionada 'semivida *in vivo*' indica la 'semivida de la proteína en suero'. Es decir, el momento en que el nivel de proteína G-CSF se redujo a 50 % en la concentración inicial durante su circulación en suero se expresó numéricamente. El cálculo farmacocinético se realizó utilizando Pksolver v2.0.

<7-1> Prueba en animales de la proteína mutante G-CSF

Se realizó una prueba en animales para determinar la duración de la proteína mutante CSF de la invención y su proteína de fusión en el cuerpo. Qu-BEST Consulting Co., Ltd. Realizó todos los procedimientos, como la compra, reproducción, administración y recolección de sangre de los animales de prueba.

Para los animales de prueba, se compraron ratones macho ICR y SPF de 6 semanas de edad de Samtako. Los ratones fueron inspeccionados y adaptados durante al menos 6 días. En el último día del período de adaptación, se midió el peso individual. En función del peso corporal, se seleccionaron animales sanos sin aumento de peso y síntomas generales y se organizaron de forma aleatoria para que el peso medio de cada grupo fuera lo más equitativo posible (35~45 g por animal). A cada grupo experimental se le asignaron 6 animales.

El día de la administración de la muestra de prueba, se calculó una dosis unitaria para cada animal (5 ml/kg) en función del peso corporal medido inmediatamente antes de la administración. La proteína mutante G-CSF (20 µg/kg) o la proteína de fusión transferrina mutante G-CSF (100 µg/kg) se inyectaron lentamente en el Bolus Intravenoso utilizando una jeringa desechable (1 ml, aguja 26G). El día de la administración se definió como el día 1 de la prueba.

Después de la inyección, se extrajo sangre de los animales mediante una recogida orbital en el punto de tiempo de 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas, respectivamente. La muestra de sangre se centrifugó a 10.000~13.000 rpm durante 1~2 minutos para separar el plasma. El plasma separado se cargó en un tubo (aproximadamente 50 µL/tubo) con una etiqueta que contiene la información del tipo de prueba, el número de animal y el tiempo de muestreo. El tubo se almacenó en un congelador profundo (aproximadamente -70 °C) hasta el día del análisis.

45 <7-2> Farmacocinética de ratón de proteínas mutantes de G-CSF

La cantidad de G-CSF activo en plasma se determinó mediante ELISA después de descongelar la muestra en hielo. La cuantificación de G-CSF en plasma mediante ELISA se realizó utilizando el kit ELISA de G-CSF humano, rosado-ONE (Koma Biotech.) de acuerdo con el manual del reactivo. Se preparó la curva de calibración de la absorbancia según la concentración de proteína a la solución estándar y se determinó el contenido de mutantes de G-CSF en la solución de prueba mediante análisis de regresión.

El análisis farmacocinético no compartimental se realizó a partir del perfil de concentración media en el tiempo de cada compuesto de prueba mediante la aplicación de la entrada de análisis de no compartimiento Bolus IV al programa Pksolver v2.0. Los parámetros farmacocinéticos evalúan la semivida terminal ($t_{1/2}$).

La semivida de las proteínas en plasma se muestra en la Figura 11. Como se muestra en la Figura 11, la proteína mutante G-CSF(T116C) mostró una semivida en sangre similar a la del G-CSF humano natural. Este es el resultado

de una tasa de filtración similar en el riñón, ya que la proteína mutante G-CSF(T116C) tiene un radio de proteína similar al G-CSF. La proteína G-CSF-Tf mostró una semivida en la sangre mejorada en comparación con el G-CSF. Esto se debe a que la fusión de la transferrina a la proteína G-CSF produce un aumento significativo en el radio de la proteína, lo que resulta en una tasa de filtración renal significativamente más baja. La proteína de fusión G-CSF(T116C)-Tf en la que se fusionó G-CSF(T116C) con transferrina mostró una semivida más prolongada que la de G-CSF-Tf, pero mostró una semivida similar a la de G-CSF PEGilado. Por lo tanto, se sugirió que cuando la proteína mutante G-CSF(T116C) que tenía la resistencia incrementada contra la proteasa de la sangre se fusionaba con la transferrina, la tasa de filtración renal disminuía y la estabilidad de la sangre mejoraba, dando como resultado la maximización de la semivida sanguínea *in vivo* (Figura 11).

10 **Ejemplo 8: Farmacodinámica de proteínas mutantes de G-CSF en ratas leucopenia**

Para obtener los índices farmacocinéticos de las proteínas de la presente invención, se realizó un análisis hematológico utilizando un modelo de enfermedad de rata (rata neutropénica). Qu-BEST Consulting Co., Ltd. Realizó todos los procedimientos, tales como la compra, reproducción, administración y análisis hematológico de los animales de prueba. Los elementos del análisis hematológico incluyen WBC, NEU, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, y el recuento diferencial de leucocitos, etc.

Se adaptaron ratas SPF Sprague Dawley de 5 semanas de edad durante al menos 5 días y luego se asignaron al azar en cuatro grupos. Cada rata estaba en el rango de peso de 350~400 g. Un día antes de la administración de la muestra de ensayo, se administró por vía intraperitoneal ciclofosfamida (90 mg/kg) una vez para inducir leucopenia (neutropénica). Las ratas SD se administraron por vía intravenosa con G-CSF una vez, seguido de pruebas hematológicas durante 5 días. El compuesto de ensayo se diluyó en PBS (solución salina tamponada con fosfato) para obtener la concentración final de 0,004 mg/ml. El día de la administración de la muestra de prueba, se calculó una dosis unitaria para cada animal (2 ml/kg) en función del peso corporal medido inmediatamente antes de la administración. La muestra de prueba se inyectó lentamente en el Bolus Intravenoso utilizando una jeringa desechable (1 ml, aguja 26G). El día de la administración se definió como el día 1 de la prueba.

Antes de la administración y 6, 12, 24, 48 y 72 horas después de la administración, se realizó una extracción de sangre (aproximadamente 200 µl en la vena yugular utilizando una jeringa desechable (1 ml, aguja 26G). La sangre se almacenó en el tubo tratado con un anticoagulante (EDTA al 5 % de sodio) para evitar la coagulación de la sangre. Los componentes en la sangre se analizaron con un analizador automático de sangre en un estado refrigerado dentro de las 3 horas. Los resultados se presentan con el valor medio y la desviación estándar. La diferencia entre el control y cada grupo experimental se comparó estadísticamente mediante el uso de GraphPad Prism mediante ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett.

Los niveles de neutrófilos dependientes del tiempo después de la administración de G-CSF-Tf y sus proteínas mutantes se presentaron en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 12, a partir de la comparación de los niveles de neutrófilos entre las muestras de prueba, se confirmó que el grupo G-CSF(T116C)-Tf administrado mostró un recuento de neutrófilos absoluto más alto que el de los grupos administrados con G-CSF y G-CSF PEGilado después de 6 y 12 horas desde la administración. El recuento absoluto de neutrófilos de G-CSF fue un poco más alto que el del control 24 horas después de la administración, aunque no fue significativo. Mientras tanto, el G-CSF PEGilado y el G-CSF(T116C)-Tf mostraron el aumento de los niveles de WBC (glóbulos blancos) y de neutrófilos en ratas con leucopenia inducida por ciclofosfamida hasta 24 horas después de la administración. La proteína de fusión G-CSF(T116C)-Tf se hizo circular *in vivo* utilizando transferrina como mediador, durante el cual la actividad *in vivo* se mantuvo más tiempo que el G-CSF y fue tan alta como la del G-CSF PEGilado. Por otro lado, los parámetros farmacocinéticos (C_{max} y AUC_{0-t}) de la proteína de fusión fueron más altos que los del G-CSF, como se muestra en la Figura 9. Esto parece ser porque la proliferación de células precursoras neutrófilas fue mayor en la proteína que en G-CSF PEGilado en el mismo periodo de tiempo (Figura 12).

45 **Aplicabilidad industrial**

El material inducido en esta invención exhibe una actividad biológica similar al G-CSF que se ha usado clínicamente, de modo que el material de la presente invención se puede usar para el tratamiento de la enfermedad isquémica o como un adyuvante anticáncer para la prevención de complicaciones infecciosas causada por la neutropenia como resultado de la quimioterapia o la radioterapia para el tratamiento del cáncer debido a su actividad de estimulación de granulopoyesis de neutrófilos.

Listado de secuencias

<110> EQUISZAROO

<120> Composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas mutantes de factor estimulante de colonias de granulocitos o proteínas de fusión de transferrina de las mismas

55 <130> 2014fpo-09-019

<160> 21

<170>Kopatentin 2.0

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

5 <213> Proteína G-CSF

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

10 <211> 679

<212> PRT

<213> Proteína transferrina

<400> 2

ES 2 735 899 T3

115	120	125
Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys		
130	135	140
Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro		
145	150	155 160
Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly		
	165	170 175
Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe		
	180	185 190
Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser		
	195	200 205
Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu		
	210	215 220
Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp		
	225	230 235 240
Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met		
	245	250 255
Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu		
	260	265 270
His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro		
	275	280 285
His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys		
	290	295 300
Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val		
	305	310 315 320
Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr		
	325	330 335

ES 2 735 899 T3

Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg
 340 345 350

Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys
 355 360 365

Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly
 370 375 380

Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly
 385 390 395 400

Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp
 405 410 415

Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val
 420 425 430

Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys
 435 440 445

Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met
 450 455 460

Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe
 465 470 475 480

Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys
 485 490 495

Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu
 500 505 510

Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly
 515 520 525

Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly
 530 535 540

ES 2 735 899 T3

Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu
 545 550 555 560

Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn
 565 570 575

Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp
 580 585 590

Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe
 595 600 605

Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser
 610 615 620

Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys
 625 630 635 640

Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val
 645 650 655

Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu
 660 665 670

Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
 675

<210> 3

<211> 174

<212> PRT

5 <213> Proteína G-CSF(T116C)

<400> 3

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

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

ES 2 735 899 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 855

<212> PRT

5 <213> Proteína G-CSF-Tf

<400> 4

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

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

ES 2 735 899 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala
 180 185 190

Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser
 195 200 205

Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys
 210 215 220

Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala
 225 230 235 240

Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val

ES 2 735 899 T3

	245		250		255
Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr					
	260		265		270
Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu					
	275		280		285
Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp					
	290		295		300
Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys					
	305		310		315
Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro					
			325		330
					335
Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly					
	340		345		350
Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe					
	355		360		365
Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser					
	370		375		380
Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu					
	385		390		395
Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp					
			405		410
					415
Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met					
	420		425		430
Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu					
	435		440		445
His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro					
	450		455		460

ES 2 735 899 T3

His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys
 465 470 475 480

Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val
 485 490 495

Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr
 500 505 510

Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg
 515 520 525

Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys
 530 535 540

Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly
 545 550 555 560

Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly
 565 570 575

Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp
 580 585 590

Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val
 595 600 605

Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys
 610 615 620

Ser Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met
 625 630 635 640

Gly Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe
 645 650 655

Ser Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys
 660 665 670

ES 2 735 899 T3

Leu Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu
 675 680 685
 Gly Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly
 690 695 700
 Asp Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly
 705 710 715 720
 Lys Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu
 725 730 735
 Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn
 740 745 750
 Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp
 755 760 765
 Lys Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe
 770 775 780
 Gly Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser
 785 790 795 800
 Glu Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys
 805 810 815
 Leu His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val
 820 825 830
 Lys Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu
 835 840 845
 Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
 850 855

<210> 5

<211> 855

<212> PRT

5 <213> Proteína G-CSF(T116C)-Tf

<400> 5

ES 2 735 899 T3

195		200		205
Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys				
210		215		220
Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala				
225		230		235 240
Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val				
	245		250	255
Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr				
	260		265	270
Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu				
	275		280	285
Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp				
290		295		300
Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys				
305		310		315 320
Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro				
	325		330	335
Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly				
	340		345	350
Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe				
	355		360	365
Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser				
	370		375	380
Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu				
385		390		395 400
Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp				
	405		410	415

ES 2 735 899 T3

Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met
 420 425 430

Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu
 435 440 445

His Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro
 450 455 460

His Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys
 465 470 475 480

Val Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val
 485 490 495

Thr Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr
 500 505 510

Asp Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg
 515 520 525

Leu Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys
 530 535 540

Val Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly
 545 550 555 560

Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly
 565 570 575

Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp
 580 585 590

Asn Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val
 595 600 605

Lys Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys
 610 615 620

ES 2 735 899 T3

835

840

845

Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro

850

855

<210> 6

<211> 2097

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector pCDNA3.1(+)/preTf

<400> 6

```

atgaggctcg ccgtgggagc cctgctggtc tgcgccgtcc tggggctgtg tctggctgtc      60
cctgataaaa ctgtgagatg gtgtgcagtg tccgagcatg aggccactaa gtgccagagt      120
ttccgcgacc atatgaaaag cgtcattcca tccgatggtc ccagtgttgc ttgtgtgaag      180
aaagcctcct accttgattg catcagggcc attgcggcaa acgaagcggg tgctgtgaca      240
ctggatgcag gtttgggtga tgatgettac ctggctccca ataacctgaa gcctgtgggt      300
gcagagttct atgggtcaaa agaggatcca cagactttct attatgctgt tgctgtgggt      360
aagaaggata gtggcttcca gatgaaccag cttcgaggca agaagtcctg ccacacgggt      420
ctaggcaggt ccgctgggtg gaacatcccc ataggettac tttactgtga cttacctgag      480
ccacgtaaac ctcttgagaa agcagtggcc aattttctct cgggcagctg tgccccctgt      540
gcggatggga cggacttccc ccagctgtgt caactgtgtc caggggtgtg ctgctccacc      600
cttaaccaat acttcggcta ctcaggagcc ttcaagtgtc tgaaggatgg tgctggggat      660
gtggcctttg tcaagcactc gactatattt gagaacttgg caaacaaggc tgacagggac      720

```

10

ES 2 735 899 T3

cagtatgagc tgctttgcect ggacaacacc cgggaagccgg tagatgaata caaggactgc	780
caettggccc aggtcecttc tcataccgtc gtggcccga gstatggcgg caaggaggac	840
ttgatctggg agctttctcaa ccaggcccag gaacatthttg gcaaagacaa atcaaaagaa	900
ttccaactat tcagctctcc tcattgggaag gacctgctgt ttaaggactc tgcccacggg	960
tttttaaag tccccccag gatggatgcc aagatgtacc tgggctatga gtatgtcact	1020
gccatccgga atctacggga aggcacatgc ccagaagccc caacagatga atgcaagcct	1080
gtgaagtggg gtgcgctgag ccaccacgag aggctcaagt gtgatgagtg gagtgttaac	1140
agtgtagggg aaatagagtg tgtatcagca gagaccaccg aagactgcat cgccaagatc	1200
atgaatggag aagctgatgc catgagcttg gatggagggt ttgtctacat agcgggcaag	1260
tgtggtctgg tgccctgtctt ggcagaaaac tacaataaga gcgataattg tgaggataca	1320
ccagaggcag ggtatthttgc tgtagcagtg gtgaagaaat cagcttctga cctcacctgg	1380
gacaatctga aaggcaagaa gtccctgccat acggcagttg gcagaaccgc tggctggaac	1440
atccccatgg gctgctcta caataagatc aaccactgca gatttgatga atthttcagt	1500
gaaggttggt cccctgggtc taagaaagac tccagtctct gtaagctgtg tatgggctca	1560
ggcctaaacc tgtgtgaacc caacaacaaa gagggatact acggctacac aggcgctttc	1620
aggtgtctgg ttgagaaggg agatgtggcc thttgtgaaac accagactgt cccacagaac	1680
actgggggaa aaaacctga tccatgggct aagaatctga atgaaaaaga ctatgagttg	1740
ctgtgccttg atggtaccag gaaacctgtg gaggagtatg cgaactgcca cctggccaga	1800
gccccgaatc acgctgtggg cacacggaaa gataaggaag cttgctcca caagatatta	1860
cgtaacagc agcacctatt tgggaagcaac gtaactgact gctcgggcaa cthttgthttg	1920
ttccggctgg aaaccaagga cthttctgttc agagatgaca cagtatgthtt ggccaaactt	1980
catgacagaa acacatatga aaaacttca ggagaagaat atgtcaaggc tgttggtaac	2040
ctgagaaaat gctccacctc atcactcctg gaagcctgca cthttccgtag accttaa	2097

ES 2 735 899 T3

<210> 7
 <211> 2097
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Vector pcDNA3.1(+)/preTf(B)

<400> 7

atgaggetcg ccgtgggagc cctgctggtc tgcgcctcc tggggctgtg tctggctgc	60
cctgataaaa ctgtgagatg gtgtgcagtg tcggagcatg aggccactaa gtgccagagt	120
ttccgcgacc atatgaaaag cgtcattcca tccgatggtc ccagtgttgc ttgtgtgaag	180
aaagcctcct accttgattg catcagggcc attgcggcaa acgaagcgga tgctgtgaca	240
ctggatgcag gtttgggtga tgatgcttac ctggctccca ataacctgaa gcctgtggtg	300
gcagagttct atgggtcaaa agaggaccca cagactttct attatgctgt tgctgtggtg	360
aagaaggata gtggcttcca gatgaaccag ctccgaggca agaagtctg ccacacgggt	420
ctaggcaggt ccgctgggtg gaacatcccc ataggcttac tttactgtga cttacctgag	480
ccacgtaaac ctcttgagaa agcagtggcc aatttcttct cgggcagctg tgccccttgt	540
gcggatggga cggacttccc ccagctgtgt caactgtgtc caggggtgtg ctgctccacc	600
cttaaccaat acttcggcta ctcaggagcc ttcaagtgtc tgaaggatgg tgctggggat	660
gtggcctttg tcaagcactc gactatattt gagaacttgg caaacaaggc tgacagggac	720

ES 2 735 899 T3

cagtatgagc tgctttgcct ggacaacacc cggaagccgg tagatgaata caaggactgc	780
cacttggccc aggtcccttc tcataccgtc gtggcccga gtatgggctg caaggaggac	840
ttgatctggg agctttctca ccaggcccag gaacatcttg gcaaagacaa atcaaaagaa	900
ttccaactat tcagctctcc tcattgggaag gacctgctgt ttaaggactc tgcccacggg	960
tttttaaag tccccccag gatggatgcc aagatgtacc tgggctatga gtatgtcact	1020
gccatccgga atctacggga aggcacatgc ccagaagccc caacagatga atgcaagcct	1080
gtgaagtggg gtgcgctgag ccaccacgag aggetcaagt gtgatgagtg gagggttaac	1140
agtgtaggga aatagagtg tgtatcagca gagaccaccg aagactgcat cgccaagatc	1200
atgaatggag aagctgatgc catgagcttg gatggagggt ttgtctacat agcgggcaag	1260
tgtggtctgg tgctgtctt ggcagaaaac tacaataaga gcgataattg tgaggataca	1320
ccagaggcag ggtatcttgc tgtagcagtg gtgaagaaat cagcttctga cctcacctgg	1380
gacaatctga aaggcaagaa gtctgcat acggcagttg gcagaaccgc tggctggaac	1440
atccccatgg gctgctcta caataagatc aaccactgca gatttgatga attttctagt	1500
gaaggttgtg cccctgggtc taagaaagac tccagtctct gtaagctgtg tatgggctca	1560
ggcctaaacc tgtgtgaacc caacaacaaa gagggatact acggctacac aggcgctttc	1620
aggtgtctgg ttgagaaggg agatgtggcc tttgtgaaac accagactgt cccacagaac	1680
actgggggaa aaaaccctga tccatgggct aagaatctga atgaaaaaga ctatgagttg	1740
ctgtgccttg atggtaccag gaaacctgtg gaggagtatg cgaactgcca cctggccaga	1800
gccccgaatc acgctgtggg cacacggaaa gataaggaag cttgcgtcca caagatatta	1860
cgtcaacagc agcacctatt tggaaagcaac gtaactgact gctcgggcaa cttttgtttg	1920

ES 2 735 899 T3

ttccggtcgg aaaccaagga ccttctgttc agagatgaca cagtatgttt ggccaaactt 1980
 catgacagaa acacatatga aaaataactta ggagaagaat atgtcaaggc tgttggtaac 2040
 ctgagaaaat gctccacctc atcactcctg gaagcctgca ctttccgtag accttaa 2097

<210> 8
 <211> 2040
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Vector pcDNA3.1(+)/Tf(B)

<400> 8
 gtccctgata aaactgtgag atgggtgtgca gtgtcggagc atgaggccac taagtgccag 60
 agtttccgcg accatatgaa aagcgtcatt ccatccgatg gtcccagtgt tgcttgtgtg 120
 aagaaagcct cctaccttga ttgcatcagg gccattgctg caaacgaagc ggatgctgtg 180
 acaactggatg caggtttggg gtatgatgct tacctggctc ccaataacct gaagcctgtg 240
 gtggcagagt tctatgggtc aaaagaggac ccacagactt tctattatgc tgttgcctgtg 300
 gtgaagaagg atagtggctt ccagatgaac cagcttcgag gcaagaagtc ctgccacacg 360
 ggtctaggca ggtccgctgg gtggaacatc cccataggct tactttactg tgacttacct 420
 gagccacgta aacctcttga gaaagcagtg gccaatctct tctcgggcag ctgtgccctt 480
 tgtgcggatg ggacggactt cccccagctg tgtcaactgt gtccaggggtg tggetgctcc 540
 acccttaacc aatacttcgg ctactcagga gccttcaagt gtctgaagga tggctgtggg 600
 gatgtggcct ttgtcaagca ctcgactata tttgagaact tggcaaacia ggctgacagg 660

10

ES 2 735 899 T3

gaccagtatg agctgctttg cctggacaac acccggaagc cggtagatga atacaaggac 720

tgccacttgg cccaggtccc ttctcatacc gtcgtggccc gaagtatggg cggcaaggag 780

gacttgatct gggagcttct caaccaggcc caggaacatt ttggcaaaga caaatcaaaa 840

gaattccaac tattcagctc tctcatggg aaggacctgc tgtttaagga ctctgcccac 900

gggtttttaa aagtcccccc caggatggat gccaatgt acctgggcta tgagtatgtc 960

actgccatcc ggaatctacg ggaaggcaca tgcccagaag cccaacaga tgaatgcaag 1020

cctgtgaagt ggtgtgcgct gagccaccac gagaggctca agtgtgatga gtggagtgtt 1080

aacagtgtag ggaaaataga gtgtgtatca gcagagacca ccgaagactg catcgccaag 1140

atcatgaatg gagaagctga tgccatgagc ttggatggag ggtttgtcta catagcgggc 1200

aagtgtggtc tggtgccctgt cttggcagaa aactacaata agagcgataa ttgtgaggat 1260

acaccagagg caggtatatt tgctgtagca gtgtggaaga aatcagcttc tgacctcacc 1320

tgggacaatc tgaaaggcaa gaagtcctgc catacggcag ttggcagaac cgctggctgg 1380

aacatcccca tgggcctgct ctacaataag atcaaccact gcagatttga tgaatttttc 1440

agtgaaggtt gtgcccctgg gtctaagaaa gactccagtc tctgtaagct gtgtatgggc 1500

tcaggcctaa acctgtgtga acccaacaac aaagagggat actacggcta cacaggcgtc 1560

ttcaggtgtc tggttgagaa gggagatgtg gcctttgtga aacaccagac tgtcccacag 1620

aacactgggg gaaaaaacc tgcctcatgg gctaagaatc tgaatgaaaa agactatgag 1680

ttgctgtgcc ttgatggtac caggaaaact gtggaggagt atgcgaactg ccacctggcc 1740

agagccccga atcacgctgt ggtcacacgg aaagataagg aagcttgcgt ccacaagata 1800

ttacgtcaac agcagcacct atttggaagc aacgtaactg actgctcggg caacttttgt 1860

ES 2 735 899 T3

ttgttccggt cggaaaccaa ggaccttctg ttcagagatg acacagtatg tttggccaaa 1920
 cttcatgaca gaaacacata tgaaaaatac ttaggagaag aatatgtcaa ggctgttggg 1980
 aacctgagaa aatgctccac ctcatcactc ctggaagcct gcactttccg tagaccttaa 2040
 2040

- 5 <210> 9
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 9
 catgctagct ccacatgag gctcgccgtg ggagcc 36
- 10 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 10
 agactcgagt taaggtctac ggaaagtca g 31
- 20 <210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 11
 ctatgggtca aaagaggacc cacagacttt ctatt 35
- 30 <210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 12
 aatagaaagt ctgtgggtcc tctttgacc catag 35
- 35 <210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Péptido de señalización de transferrina
 <400> 13

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu

1 5 10 15

Cys Leu Ala

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 14

ctcggatccg tcctgataa aactgtgaga tg 32

10 <210> 15

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador PCR

<400> 15

catgctagct ccaccatggc tggacctgcc acccag 36

<210> 16

<211> 27

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 16

25 catggatccg ggctgggcaa ggtggcg 27

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador PCR

<400> 17

taatacgact cactataggg 20

<210> 18

35 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador PCR

40 <400> 18

aatagaaagt ctgtgggtcc tccttgacc catag 35

<210> 19

<211> 32

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

ES 2 735 899 T3

<220>

<223> Cebador PCR

<400> 19

gccgactttg ccacctgcat ctggcagcag at 32

5

<210> 20

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador PCR

<400> 20

atctgctgcc agatgcaggt ggcaaagtcg gc 32

<210> 21

<211> 2658

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector pcDNA3.1(+)/G-CSF(T116C)-Tf

<400> 21

atggctggac ctgccacca gagccccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg 60

cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc acccccctgg gcctgccag ctccctgccc 120

cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg 180

ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc 240

ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc ctgagcagct gccccagcca ggcctgcag 300

ctggcaggct gcttgagcca actccatagc ggccctttcc tctaccaggg gctcctgcag 360

gccttgaag ggatctccc cgagttgggt cccaccttgg acacactgca gctggacgtc 420

gccgactttg ccacctgcat ctggcagcag atggaagaac tgggaatggc cctgcacctg 480

cagcccaccc agggtgccat gccggccttc gcctctgctt tccagcgcg gccaggaggg 540

gtcctggttg cctcccctct gcagagcttc ctggagggtg cgtaccgcgt tctacgccac 600

cttgcccagc ccggatccgt cctgataaaa actgtgagat ggtgtgcagt gtcggagcat 660

gagggcacta agtgccagag ttccgcgcac catatgaaaa gcgtcattcc atccgatggg 720

cccagtgttg cttgtgtgaa gaaagcctcc taccttgatt gcatcagggc cattgcggca 780

20

ES 2 735 899 T3

aacgaagcgg atgctgtgac actggatgca ggtttggtgt atgatgctta cctggctccc	840
aataacctga agcctgtggt ggcagagttc tatgggtcaa aagaggaccc acagactttc	900
tattatgctg ttgctgtggt gaagaaggat agtggcttcc agatgaacca gcttcgaggc	960
aagaagtccct gccacacggg tctaggcagg tccgctgggt ggaacatccc cataggctta	1020
ctttactgtg acttacctga gccacgtaaa cctcttgaga aagcagtggc caatttcttc	1080
tggggcagct gtgccccttg tgcggatggg acggacttcc cccagctgtg tcaactgtgt	1140
ccaggggtg gctgctccac ccttaaccaa tactteggct actcaggagc cttcaagtgt	1200
ctgaaggatg gtgctgggga tgtggccttt gtcaagcact cgactatatt tgagaacttg	1260
gcaaacaagg ctgacagggg ccagtatgag ctgctttgcc tggacaacac ccggaagccg	1320
gtagatgaat acaaggactg ccacttgccc caggtccctt ctcataccgt cgtggcccga	1380
agtatgggcg gcaaggagga cttgatctgg gagcttctca accaggccca ggaacathtt	1440
ggcaaagaca aatcaaaaga attccaacta ttcagctctc ctcatgggaa ggacctgctg	1500
tttaaggact ctgcccacgg gtttttaaaa gtcccccca ggatggatgc caagatgtac	1560
ctgggctatg agtatgtcac tgccatccgg aatctacggg aaggcacatg cccagaagcc	1620
ccaacagatg aatgcaagcc tgtgaagtgg tgtgctgctga gccaccacga gaggctcaag	1680
tgtgatgagt ggagtgttaa cagtgtaggg aaaatagagt gtgtatcagc agagaccacc	1740
gaagactgca tcgccaagat catgaatgga gaagctgatg ccatgagctt ggatggaggg	1800
tttgtctaca tagcgggcaa gtgtggtctg gtgcctgtct tggcagaaaa ctacaataag	1860
agcgataatt gtgaggatac accagaggca gggatatttg ctgtagcagt ggtgaagaaa	1920
tcagcttctg acctcacctg ggacaatctg aaaggcaaga agtcctgccca tacggcagtt	1980

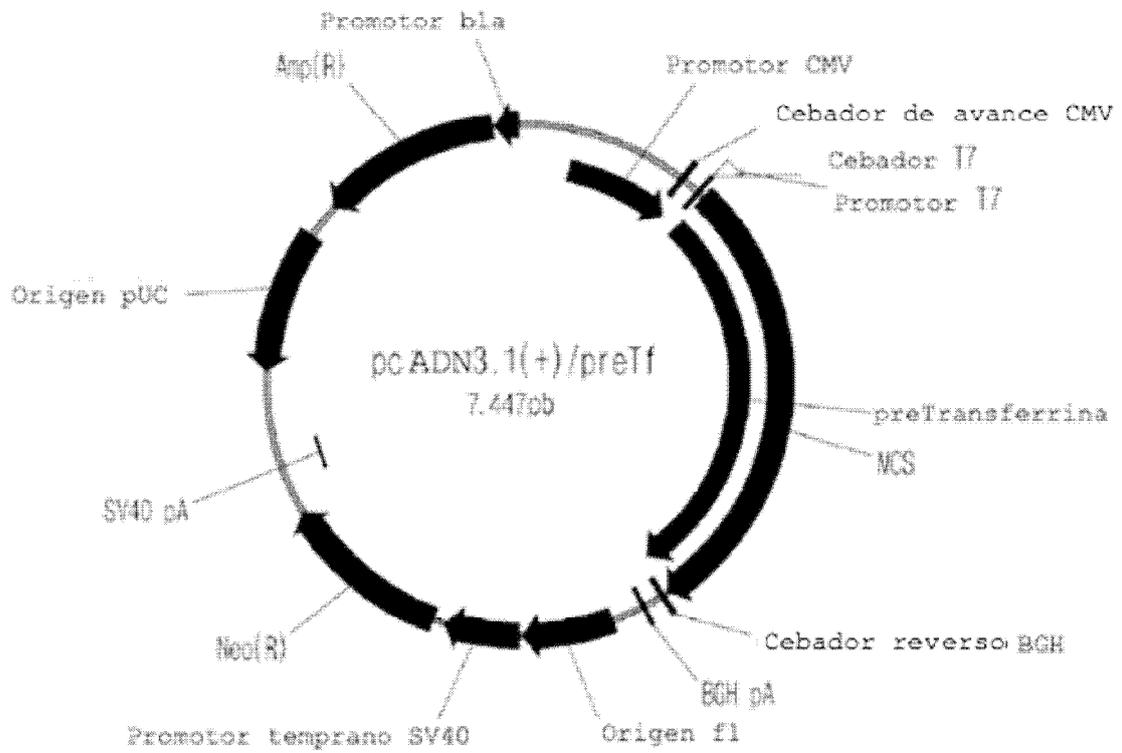
ES 2 735 899 T3

ggcagaaccg ctggctggaa catccccatg ggccctgctct acaataagat caaccactgc	2040
agatttgatg aatttttcag tgaaggttgt gccctgggt ctaagaaaga ctccagtctc	2100
tgtaagctgt gtatgggctc aggcctaaac ctgtgtgaac ccaacaacaa agagggatac	2160
tacggctaca caggcgcttt cagggtctctg gttgagaagg gagatgtggc ctttgtgaaa	2220
caccagactg tcccacagaa cactggggga aaaaacctg atccatgggc taagaatctg	2280
aatgaaaaag actatgagtt gctgtgcctt gatggtacca ggaaacctgt ggaggagtat	2340
gcgaactgcc acctggccag agccccgaat cacgctgtgg tcacacggaa agataaggaa	2400
gcttgcgtcc acaagatatt acgtcaacag cagcacctat ttggaagcaa cgtaactgac	2460
tgctcgggca acttttgttt gttccggctg gaaaccaagg accttctgtt cagagatgac	2520
acagtatggt tggccaaact tcatgacaga aacacatatg aaaaatactt aggagaagaa	2580
tatgtcaagg ctgttggtaa cctgagaaaa tgctccacct catcactcct ggaagcctgc	2640
actttccgta gaccttaa	2658

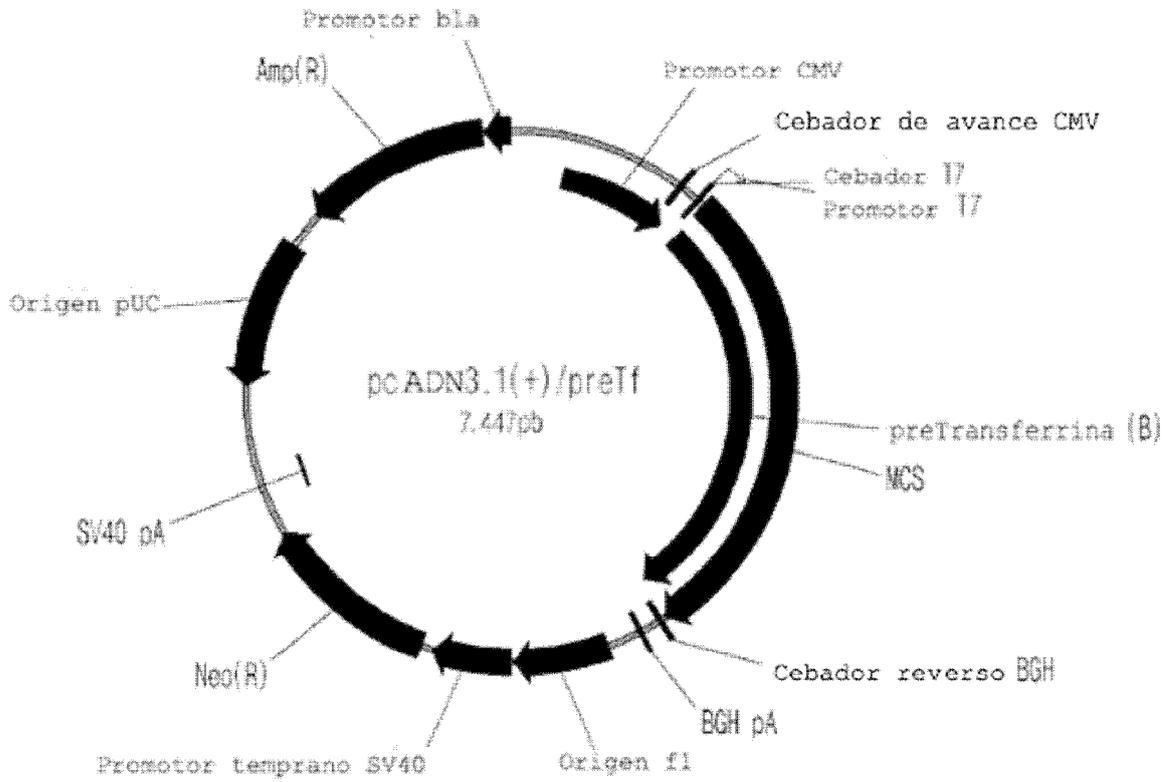
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión en la que la transferrina está unida por un péptido a un terminal de una proteína mutante del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en la que el 116º aminoácido, treonina, está sustituido con una cisteína, de manera que la cisteína es adecuada para enlaces de sulfuro con el 17º aminoácido, cisteína, de G-CSF.
2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la transferrina tiene la eliminación de un péptido de señalización en la región terminal amino.
3. La proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que la cisteína sustituida forma un enlace disulfuro con el 17º aminoácido, cisteína, de G-CSF.
- 10 4. Un vector de expresión que contiene un gen que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. El vector de expresión según la reivindicación 4, en el que la secuencia de nucleótidos de un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción en el gen está sustituida por otra secuencia de nucleótidos que codifica el mismo aminoácido.
- 15 6. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el gen que codifica la proteína de fusión tiene la sustitución de timina del sitio de reconocimiento del enzima de restricción BamHI (GGATCC) con citosina.
7. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el gen que codifica la proteína de fusión contiene adicionalmente un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción al final del gen.
- 20 8. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el vector de expresión comprende una cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 7, 8 y 21.
9. Un transformante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 4.
10. Un procedimiento de preparación de la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que contiene la etapa de obtener la proteína diana a partir del transformante de la reivindicación 9.
- 25 11. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en terapia.
12. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento de una neutropenia.
13. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento de cáncer.
- 30 14. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento de una enfermedad isquémica.
15. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en la inhibición de la disminución en el número de neutrófilos.

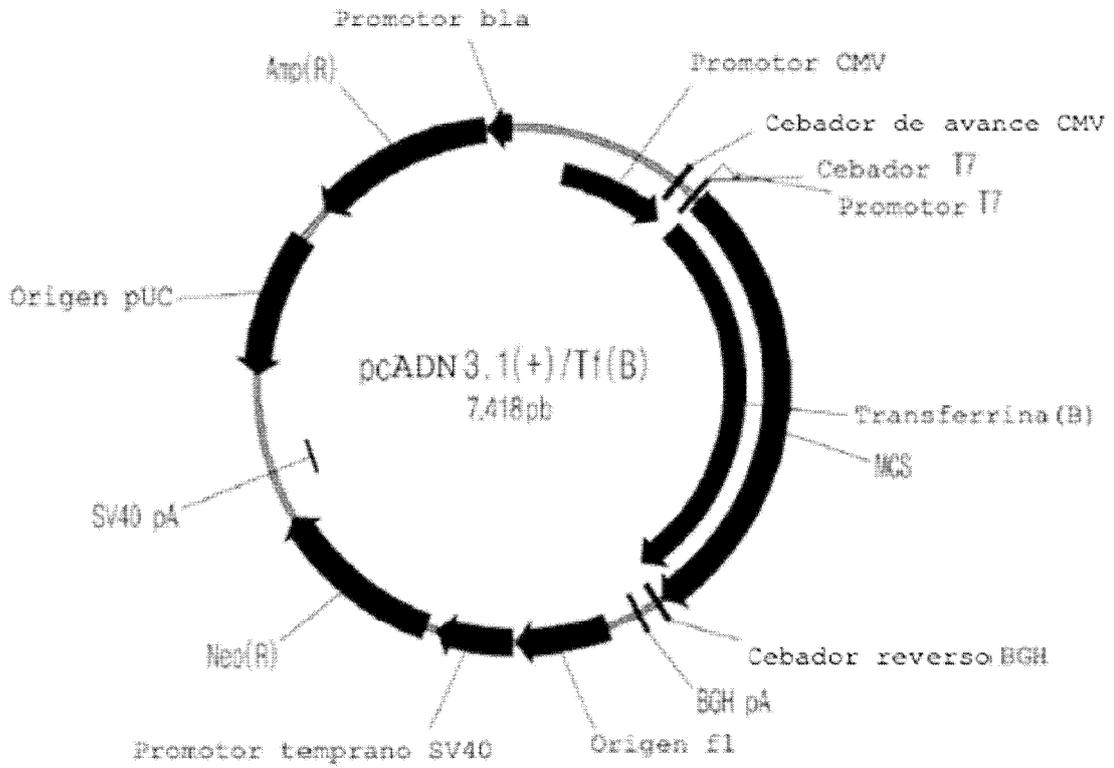
[Figura 1]



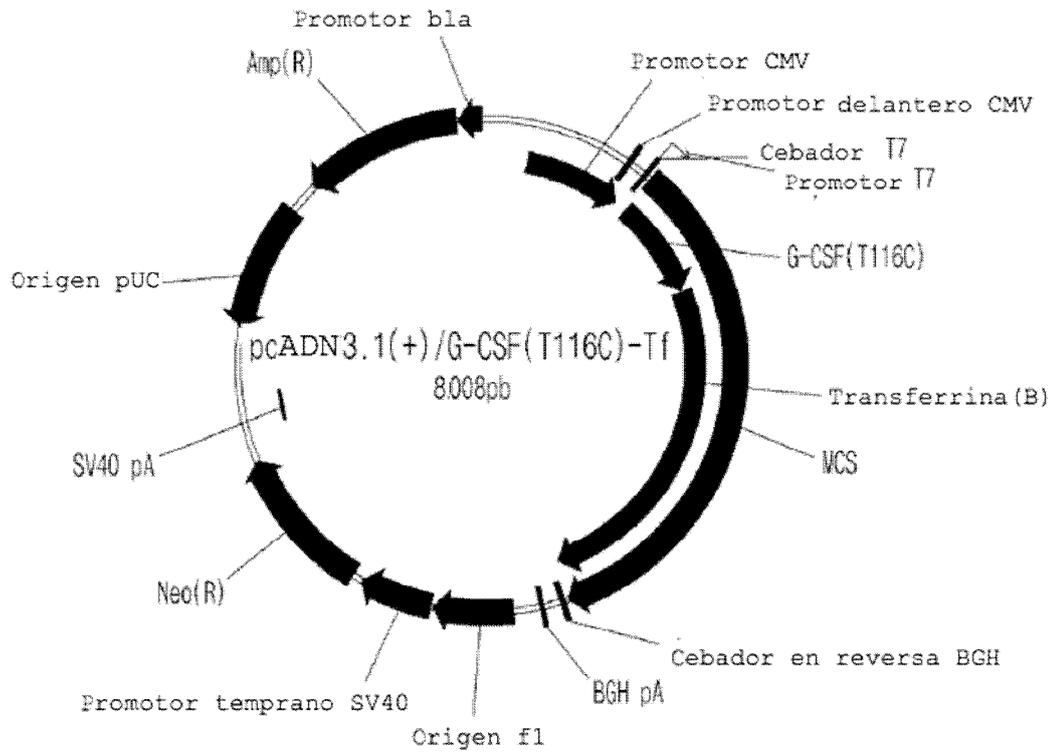
[Figura 2]



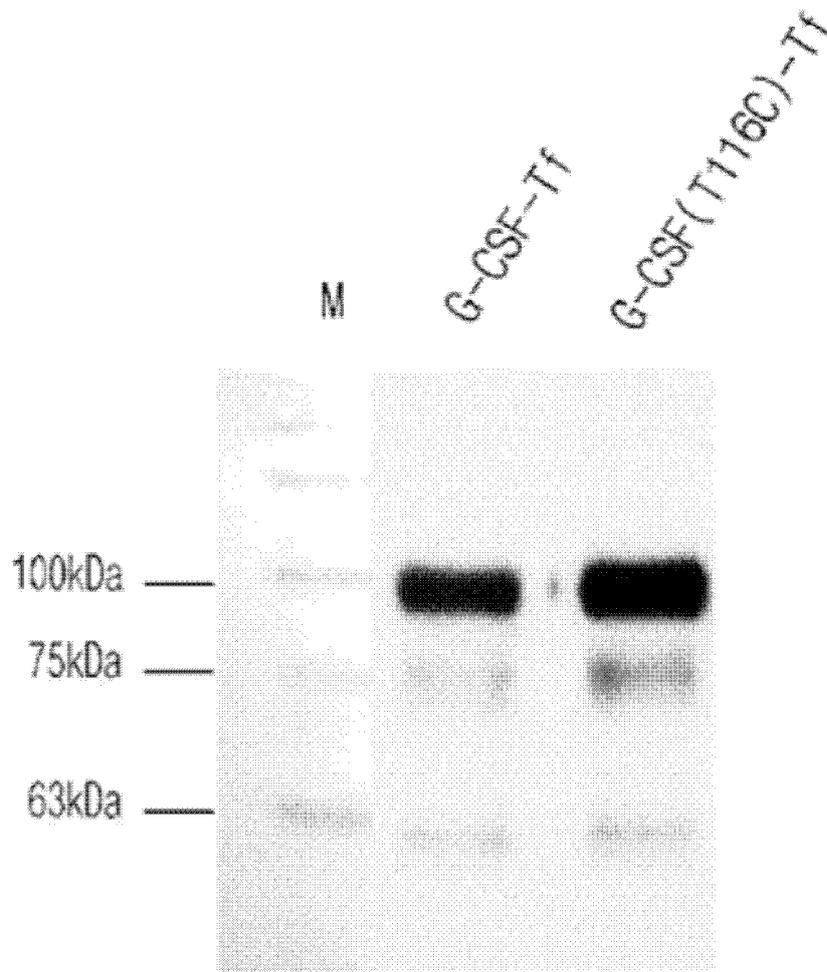
[Figura 3]



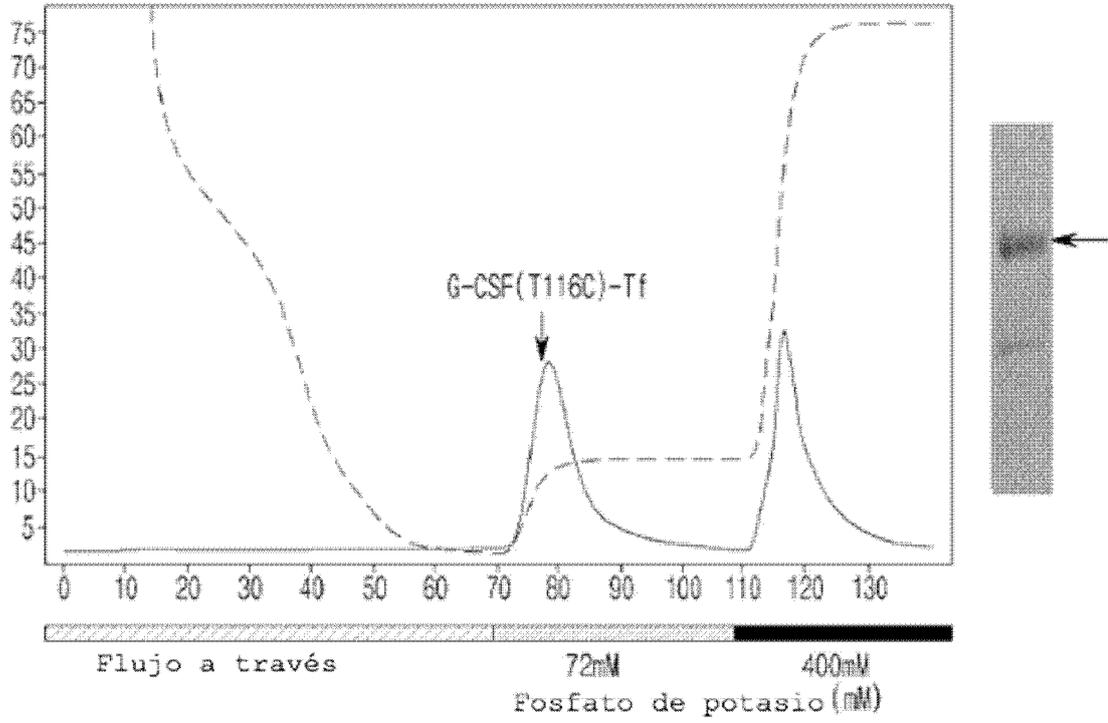
[Figura 4]



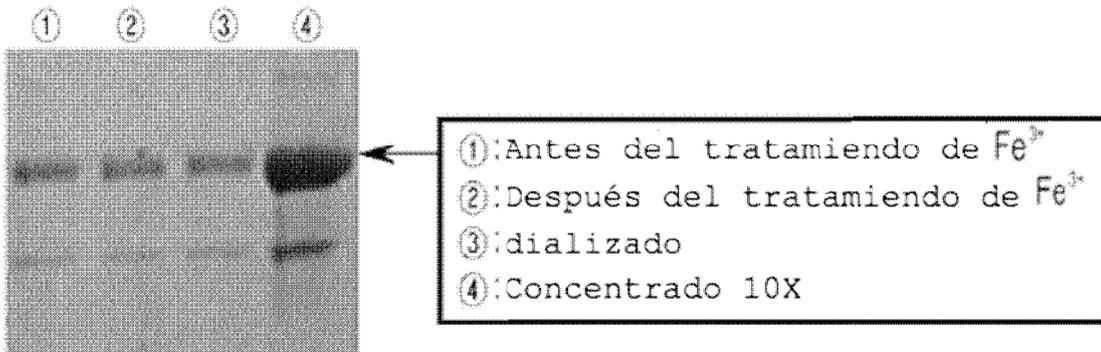
[Figura 5]



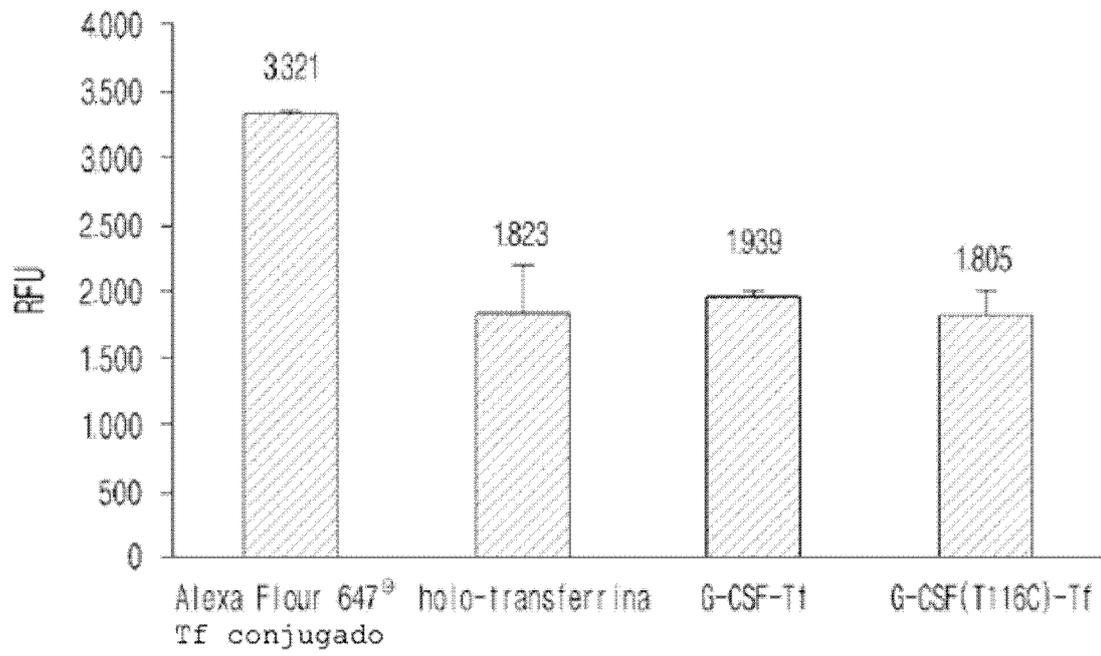
[Figura 6]



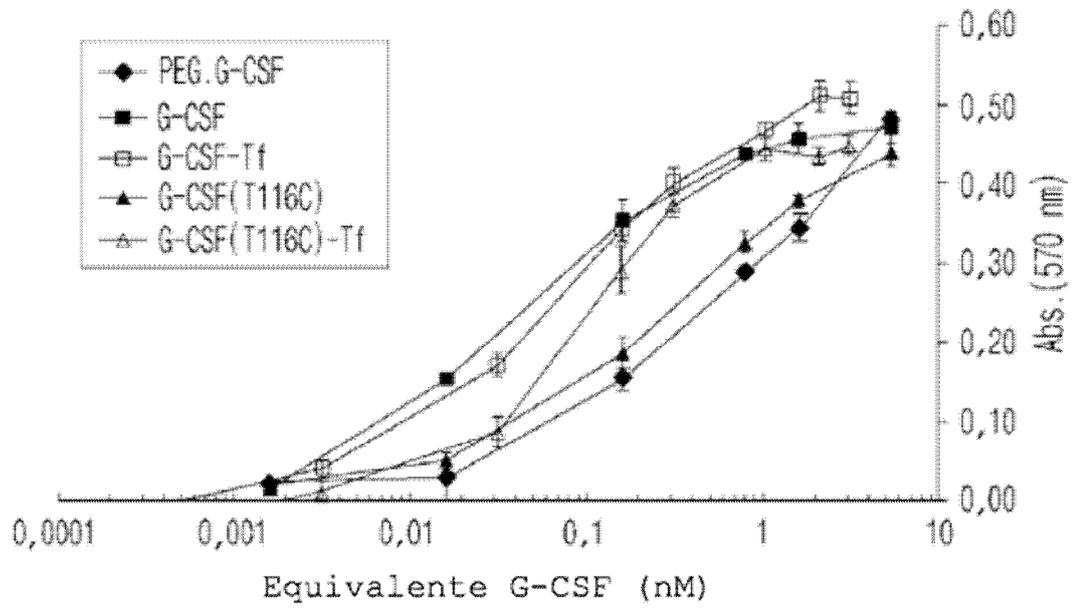
[Figura 7]



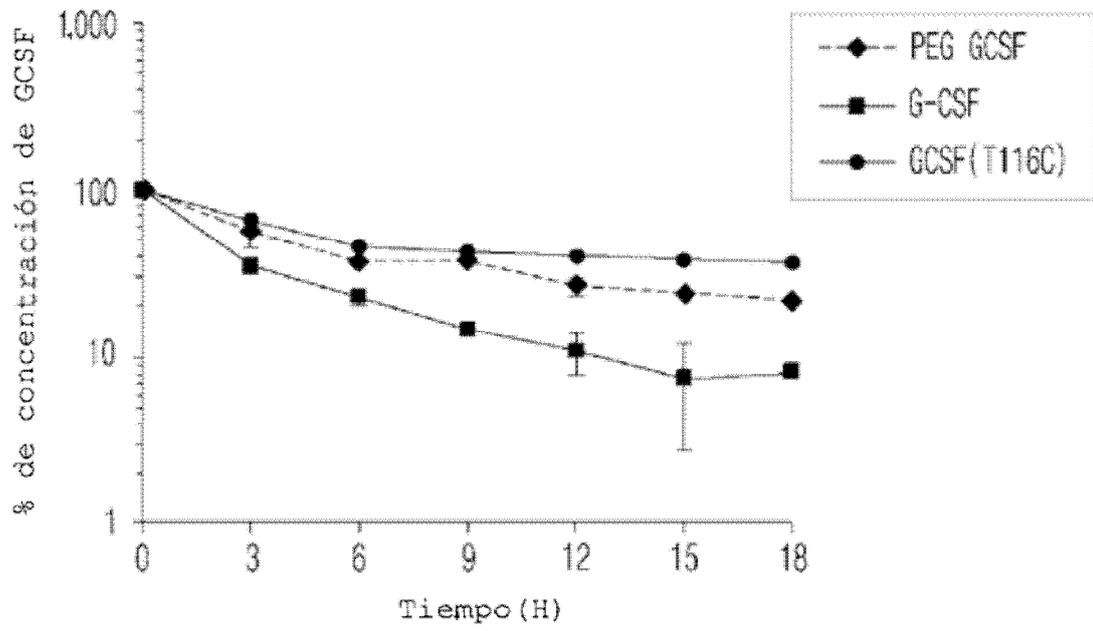
[Figura 8]



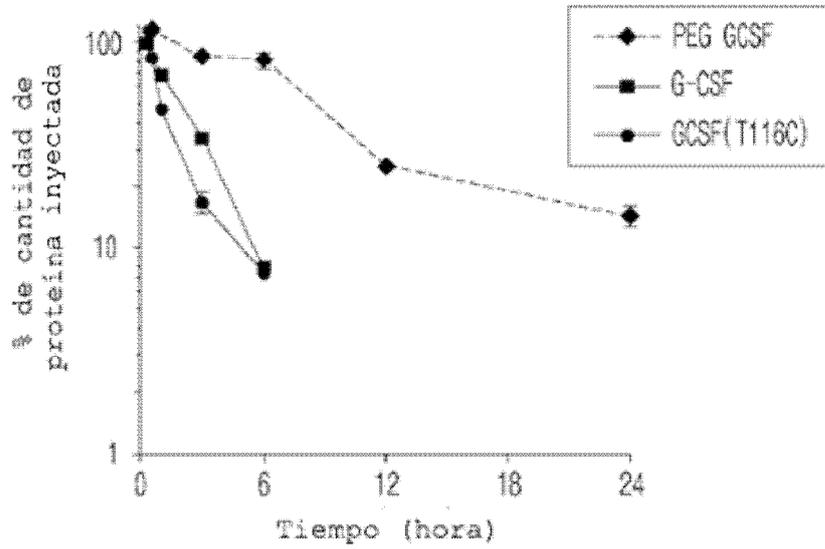
[Figura 9]



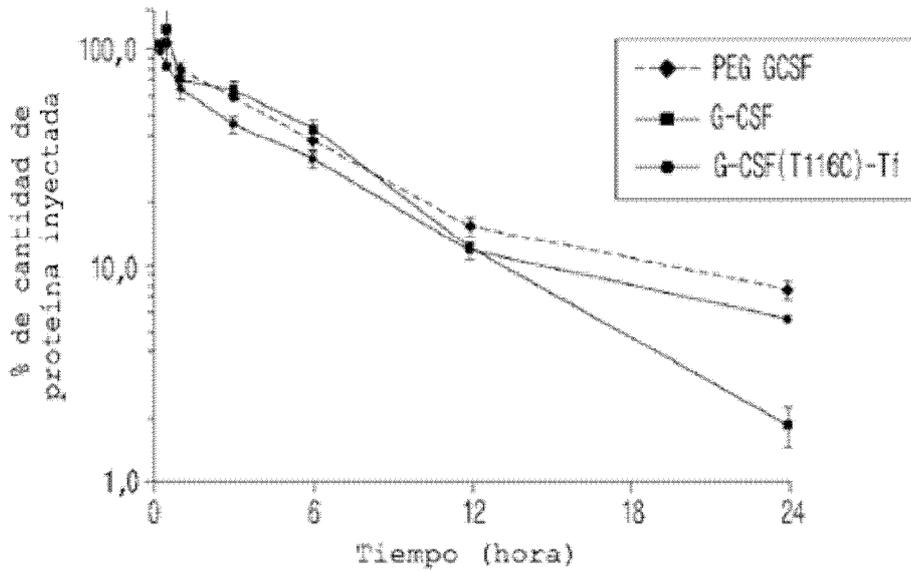
[Figura 10]



[Figura 11]



(a)

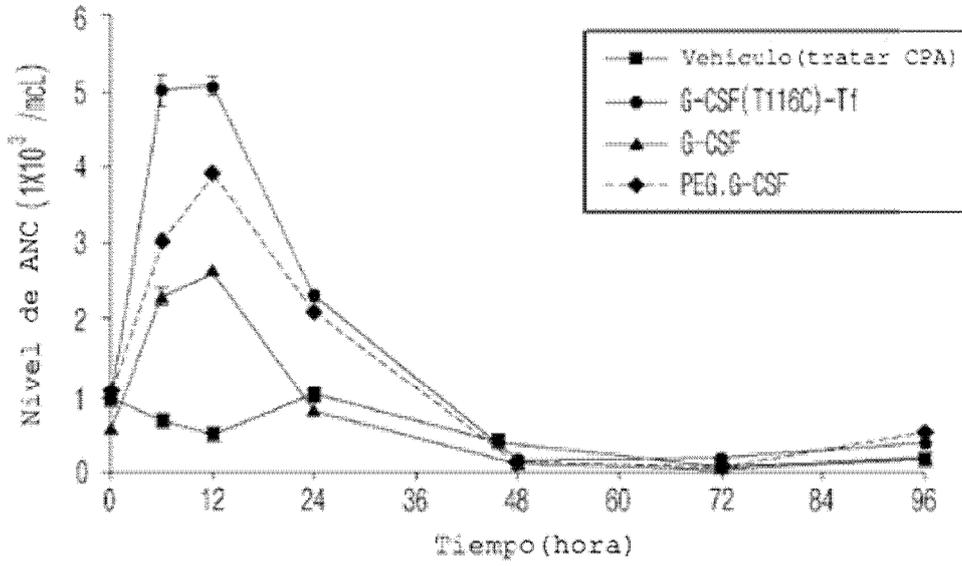


(b)

Parámetro (H)	G-CSF	G-CSF(T116C)	PEG. G-CSF	G-CSF-T1	G-CSF(T116C)-T1
$t_{1/2}$	1,88	1,84	6,77	3,95	6,50

(c)

[Figura 12]



(a)

	$T_{máx}$ (h)	$C_{máx}$ ($\times 10^3$ células μl^{-1})	AUC_{0-t} ($\times 10^3$ células $\mu l^{-1} h^{-1}$)
G-CSF	12,00	2,66	56,11
G-CSF(T116C)-T1	12,00	5,08	122,28
PEG.G-CSF	12,00	3,94	96,36

(b)