



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 280 487**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/505 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02255679 .9**
(86) Fecha de presentación : **14.08.2002**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1316561**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2003**

(54) Título: **Proteína de fusión con actividad eritropoyetina *in vivo* aumentada.**

(30) Prioridad: **03.12.2001 KR 10-2001-0075994**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

(73) Titular/es: **Cheil Jedang Corporation**
500 Namdaemun-ro, 5ga
Jung-gu, Seoul, KR

(72) Inventor/es: **Lee, Dong-Eok;**
Oh, Myung-Suk;
Kim, Ki-Wan;
Chung, Bo-Sup y
Park, Ji-Sook

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

DESCRIPCIÓN

Proteína de fusión con actividad eritropoyetina *in vivo* aumentada.

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que posee una actividad *in vivo* aumentada de un fármaco anti anemia perniciosa, eritropoyetina (en lo sucesivo también se denominará "EPO"). Más particularmente, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que tiene una actividad EPO aumentada mediante el incremento de su semivida *in vivo* con sus propias secuencias de aminoácidos, es decir, sin incrementar el contenido de glucosilación, en el que la proteína de fusión contiene una molécula de EPO condensada a un péptido concreto natural *in vivo*.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

La EPO es una glucoproteína que posee un peso molecular dentro del intervalo de 30.000 a 34.000 Da y es un factor hematopoyético que estimula la producción y diferenciación de glóbulos rojos. La glucoproteína se une a un receptor de células precursoras de glóbulos rojos para iniciar su actividad hematopoyética y causa un incremento de las cantidades de iones intracelulares de calcio y un aumento de la biosíntesis de ADN y estimulación de la formación de hemoglobina. Asimismo, la EPO recombinante humana (EPOrh) ha sido aprobada para el tratamiento de la anemia asociada con la insuficiencia renal, la prematuridad, el hipotiroidismo, la malnutrición y sucesivamente, y el uso clínico de EPOrh es cada vez mayor. No obstante, el amplio uso de EPOrh podría estar limitado por la incomodidad y los elevados costes porque la EPOrh debe administrarse aproximadamente tres veces a la semana debido a la corta semivida. Por tanto, la frecuencia de administración de EPOrh para tratamiento podría reducirse manteniendo una actividad *in vivo* de la EPO durante más tiempo.

La actividad biológica *in vivo* de la EPO es proporcional a su semivida *in vivo*, que se sabe que está relacionada con el contenido de ácido siálico en el extremo de las cadenas de azúcar en la EPO. Por tanto, la actividad biológica *in vivo* de la EPO depende en gran medida de la presencia o ausencia de cadenas de azúcar. Los tipos de cadenas de azúcar varían dependiendo de los tipos de célula. Por tanto, cuando la misma glucoproteína se expresa en células diferentes, los tipos de cadenas de azúcar de la proteína son característicamente distintos según el tipo de célula. Se sabe que las células bacterianas, por ejemplo *E. coli*, no pueden unir cadenas de azúcar a sus proteínas. Dado que se sabe que las proteínas expresadas en *E. coli* no tienen ninguna cadena de azúcar, la EPO expresada en *E. coli* no contiene cadenas de azúcar. En este caso, se confirma que la EPO es biológicamente activa *in vitro* pero no está activa *in vivo*. Esto es porque la EPO sin cadenas de azúcar se elimina más rápido del cuerpo, en comparación con la EPO con cadenas de azúcar, lo que da lugar a una semivida extremadamente corta. En consecuencia, la presencia o ausencia de cadenas de azúcar en la EPO desempeña un importante papel en la actividad biológica de la EPO.

Hasta la fecha, se han llevado a cabo muchas investigaciones exhaustivas para incrementar la actividad biológica de la EPO. La mayoría de estas investigaciones se centran en la sustitución de algunos aminoácidos induciendo la mutación de los genes de la EPO mediante técnicas de mutagénesis. Por ejemplo, el documento PCT/US94/09257, titulado "Análogos de la eritropoyetina", presentado por Amgen Inc., describió un procedimiento para incrementar una semivida *in vivo* aumentando el contenido en cadenas de azúcar en la EPO a través de mutagénesis. También se ha intentado incrementar una semivida *in vivo* a través de la formación de dímeros EPO (A. J. Sytkowski y col., J.B.C., vol. 274, n° 35, pág. 24773-24778). Otros procedimientos para incrementar la actividad biológica *in vivo* de la EPO incluyen la condensación de un aminoácido, un péptido o un fragmento de proteína nuevos con las moléculas de EPO usando ingeniería genética, y aumentar el contenido en cadenas de azúcar de la EPO, específicamente las cantidades de ácido siálico. No obstante, los tipos de aminoácidos, péptidos o fragmentos de proteínas utilizados en este procedimiento son muy limitados. En la mayoría de los casos, tales modificaciones genéticas pueden tener como resultado una disminución o pérdida de la actividad específica de la proteína o causar problemas de antigenicidad que con frecuencia se producen cuando se usan dichas sustancias *in vivo*.

Se han llevado a cabo investigaciones sobre proteínas de fusión o proteínas quiméricas, en lugar de sobre EPO, y uno de los ejemplos de las mismas es una hormona estimulante del folículo, que es una hormona sexual (Furuhashi y col., 1995, Mol. Endocrinol.). Sin embargo, tales proteínas no se han aplicado todavía en el campo porque las proteínas modificadas genéticamente a través de ingeniería genética plantean varios problemas. No es fácil obtener una proteína diana modificada en sí misma, requiere capacidades profesionales muy cualificadas. Asimismo, en la mayoría de los casos las actividades de las proteínas pueden disminuir indeseadamente o desaparecer por la adición o sustitución de nuevos aminoácidos.

En las circunstancias, los presentes inventores han comenzado estudios amplios sobre el desarrollo de un nuevo procedimiento para incrementar la actividad *in vivo* de la EPO a través de la fusión de nuevos aminoácidos, péptidos o proteínas con las moléculas de EPO. En el transcurso de estos estudios se descubrió que una proteína de fusión obtenida mediante la fusión de un péptido del extremo carboxilo (en lo sucesivo también denominado "CTP"), fragmentos de la subunidad beta de una gonadotropina coriónica humana (en lo sucesivo también denominada "HCG"), que es una proteína que aparece de forma natural *in vivo*, a la EPO, incrementa de forma espectacular la semivida *in vivo* de

la EPO. Asimismo, la EPO contiene aminoácidos que poseen la función de incrementar los sitios de glucosilación mientras conserva la actividad intrínseca de la EPO (véase, la solicitud de patente coreana nº 10-2000-0075230).

Resumen de la invención

Los presentes inventores han descubierto inesperadamente que las variantes CTP cuyo sitio de glucosilación en el péptido se habían eliminado también aumentaban considerablemente la semivida *in vivo* de la EPO. Como resultado de este hallazgo se han desarrollado variantes CTP que pueden incrementar la estabilidad *in vivo* de la EPO a través del uso de secuencias de aminoácidos, sin incrementar el contenido de las cadenas de azúcar en la EPO, lo que ha llevado a los presentes inventores a completar la presente invención.

La presente invención, en la que se usan variantes CTP cuyos sitios de glucosilación se han eliminado, se puede distinguir de la técnica anterior, en la que se aumenta la semivida *in vivo* incrementando el contenido de las cadenas de azúcar en la EPO, y se basa en el descubrimiento de variantes CTP capaces de incrementar la estabilidad *in vivo* de la EPO.

En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar una proteína de fusión que posea una actividad aumentada *in vivo* de la EPO humana, en la que la proteína de fusión incluya una molécula de EPO fusionada a una variante CTP de una subunidad β de HCG en su extremo carboxilo.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un ácido nucleico que codifique la proteína de fusión, un vector recombinante que contenga el ácido nucleico y una línea celular sometida a transfección con el plásmido recombinante.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar una proteína de fusión que posea una actividad aumentada *in vivo* de la EPO humana mediante el cultivo de la línea celular transformada.

Por tanto, visto desde un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende eritropoyetina humana (EPO) que posee un extremo carboxilo y un mutante unido al extremo carboxilo, donde dicho mutante posee una secuencia de aminoácidos desde la posición 7 a la posición 34 en la SEC ID N° 1 con de una a cuatro sustituciones de aminoácidos en las posiciones 10, 61, 21 y 27 de la SEC ID N° 1.1

Visto desde otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva.

Visto desde otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una proteína de fusión que posea una actividad aumentada *in vivo* de la EPO, que comprende:

cultivar una línea celular transformada transformante sometida a transfección con un vector recombinante que contenga el ácido nucleico como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva.

Visto desde todavía otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva con uno o más transportadores, adyuvantes, excipientes fisiológicamente tolerables.

Visto desde todavía otro aspecto más, la presente invención proporciona una proteína de fusión como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva para usar como un medicamento.

Visto desde todavía otro aspecto más, la presente invención proporciona proteínas de fusión como se ha definido anteriormente en la presente memoria descriptiva para usar en el tratamiento de la anemia.

Visto desde todavía otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de una proteína de fusión como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar la anemia.

En una forma de realización de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión con una actividad aumentada *in vivo* de EPO humana, en la que la proteína de fusión incluye una molécula de EPO fusionada a una variante CTP de una subunidad β de HCG (en lo sucesivo, también se denomina "ATP") en su extremo carboxilo. Preferentemente, el CTP incluye todos o algunos de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 112-145, preferentemente a las posiciones 118-145, de la subunidad β de HCG, en la que los aminoácidos se describen mediante la SEC ID N° 1.

ATP, Que es una variante CTP, posee la función de incrementar la semivida de la molécula de EPO con sus propias secuencias de aminoácidos, es decir sin incrementar el contenido en cadenas de azúcar de la EPO.

Por tanto, a menos que la acción de la proteína de fusión diana de incremento de una actividad *in vivo* de la EPO se vea afectada de forma adversa, las posiciones y tipos de aminoácidos que experimenten un cambio en la posición dentro del intervalo indicado anteriormente no están específicamente restringidos. En otras palabras, siempre

que la proteína de fusión mantenga la actividad de incrementar la actividad *in vivo* de la EPO, los aminoácidos de las posiciones correspondientes al intervalo indicado anteriormente pueden sustituirse en cualquier posición con cualquier aminoácido.

Por ejemplo, es preferible que la ATP posea una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 121, 127, 132 y 138, y más preferentemente posee residuos de serina (Ser) en las posiciones 121, 127, 132 y 138 sustituidos por residuos de alanina (Ala) (Fig. 1). En este caso, la proteína de fusión según la presente invención posee la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC, ID n° 2. Del hallazgo de que los residuos de Ser de las posiciones anteriores pueden sustituirse por residuos de Ala, para un experto en la técnica queda claro que cualquier otro aminoácido que posea un tamaño y carga similar a la Ala, por ejemplo glicina (Gly) puede sustituir a la Ser.

En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, un vector recombinante que contiene el ácido nucleico y una línea celular sometida a transfección con el plásmido recombinante, preferentemente un célula de ovario de hámster chino (CHO).

En todavía otra forma de realización de la presente invención se proporciona un procedimiento para preparar una proteína de fusión que posea una actividad aumentada de EPO humana mediante el cultivo de la línea celular transformada.

Breve descripción de las figuras

Los anteriores objetos y ventajas de la presente invención se harán más evidentes mediante la descripción con detalle de las formas de realización preferidas de la misma con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La Fig. 1 representa las secuencias de bases y aminoácidos de ATP como variante CTP;

La Fig. 2 representa las secuencias de bases y aminoácidos de una proteína de fusión (EATP) de EPO y ATP;

La Fig. 3 es una representación gráfica que ilustra la producción de un vector de expresión pcDNA3.1-EATP;

La Fig. 4 es una fotografía de electroforesis de EATP purificada; y

La Fig. 5 representa gráficamente los resultados del análisis farmacocinética de EATP y EPO.

Descripción detallada de la invención

A continuación la presente invención será descrita con más detalle. La presente invención se procesa mediante etapas de adquisición y clonación de genes de una proteína de fusión diana, la construcción de vectores de expresión de un gen diana, la transfección de células animales y la expresión de EATP, y la purificación de la EATP expresada y la medición de la actividad.

(1) Adquisición de genes

El ADN complementario (ADNc) de la EPO se puede adquirir empleando una técnica de reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR) convencional mediante un kit de RT-PCT Premix disponible en Bioneer Corp. Corea, en el que se usan los cebadores EP1 y EC2 complementarios de ambos extremos del ADNc de la EPO previamente preparados a partir de una biblioteca de ADNc de hígado embrionario humano (disponible en Invitrogen Corp.).

EP1: ATGGGGGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGG (SEC ID N° 3)

EC2: GTCCCCTGTCCTGCAGGCCT (SEC ID N° 4)

El ADNc de la EPO se clona en un vector de clonación pGEM-T (Promega Corp.), que se denomina pGEMT-EPO, y su secuencia de bases se identifica para usar como molde en las operaciones posteriores.

Los genes de las variantes CTP de una subunidad β de HCG usados en la presente invención se obtienen mediante síntesis artificial y PCR con auto-cebado. Los fragmentos génicos sintetizados son EA1, A2, A3 y A4:

EA1: AGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACTCCTCTTCCG (SEC ID N° 5)

A2: GGAAGGGC GGGGGAGGGGCCTTG GC GGAAGAGGA (SEC ID N° 6)

ES 2 280 487 T3

A3: CCGC CCTTCCAAGCCCAG CCCGACTCCCGGGGCCCC (SEC ID N° 7)

A4: TTATTGTGGGAGGATCGGGGTGTCG GCGGGCCCCG (SEC ID N° 8)

(Las porciones en negrita indican porciones para la sustitución de aminoácidos)

Se tome 1 μ l de cada uno de cuatro genes (50 pmoles/ μ l) para realizar una PCR usando un sistema Taq de alta fidelidad (Boehringer Mannheim Corp.).

Los fragmentos génicos (genes CTP modificados) de un tamaño de aproximadamente 110 pb se identifican en un gel de agarosa al 1%. Estos genes codifican un péptido obtenido sustituyendo 4 residuos de Ser en las posiciones 121, 127, 132 y 138 entre 28 aminoácidos del extremo carboxilo en las posiciones 118-145 de una subunidad β de HCG, con residuos de Ala (véase la Fig. 1).

La PCR se realiza usando un pGEMT-EPO como molde y con EP1 Y EC2 como cebadores, lo que sólo proporciona genes EPO. A continuación, se realiza otra PCT usando los genes de la EPO y los genes modificados de CTP como moldes y EP11 y EP22 como cebadores por medio del sistema Taq de alta fidelidad, de modo que se adquiere la proteína de fusión deseada con fragmentos de genes de aproximadamente 630 pb (que se denominarán genes EATP).

EP11: TAAGCTTATGGGGGTGCACGAATGT (SEC ID N° 9)

EP22: TGGATCCTTATTGTGGGAGGATCGGGGT (SEC ID N° 10)

Estos genes se clonan en vectores de clonación pGEM-T y a continuación se identifican las secuencias de bases (que se denominarán pGEMT-AETP) (véase la Fig. 3).

(2) Construcción de los vectores de expresión

El vector pcDNA3.1 (Invitrogen Corp.) se usa como vector de expresión. Ambos extremos del gen EATP en el pGEMT-EATP poseen sitios para las enzimas de restricción *Hind* III y *Bam*H I derivados de los cebadores EP11 y EP22. Los plásmidos pcDNA3.1 y el pGEMT-EATP obtenidos se tratan con *Hind* III y *Bam*H I. El pcDNA3.1 linealizado y el gen EATP se obtienen de un gel de agarosa usando un kit de elución e Qiagen, seguido por unión, de modo que se transforma la *E. coli* NM522. Los plásmidos se aíslan de colonias resultantes de la incubación durante la noche en un medio sólido de LB-Ampicilina y se tratan con las enzimas de restricción *Hind* III y *Bam*H I. A continuación, se selecciona sólo las colonias en las que se había insertado el gen EATP mediante electroforesis en agarosa al 1%. Los plásmidos resultantes se denominan pcDNA.3.1-EATP (véase la Fig. 3).

(3) Transfección de las células CHO y expresión de EATP

Las células CHO (DG44) se cultivan en un placa de 60 mm para preparar células confluentes 40-80% (1-4x10⁵ células/placa de 60 mm). Se mezclan 3 μ l de un reactivo de superinfección (Boehringer Mannheim Corp.) y 97 μ l de medio (α -MEM con medio, sin suero y sin antibiótico) suficientemente a la mezcla resultante se añaden aproximadamente 2 μ g de un plásmido pcDNA3.1-ADN EATP (más de 0,1 μ g/ μ l) y 0,02 μ g de un vector pLTRdhfr26 (ATCC37295) que contiene el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr) y se hacen reaccionar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y después se añade a las células. Después de un día, los medios se sustituyen con α -MEM sin medio (que contiene 500 μ g/ml de G418) con FBS al 10%. Las células se vuelven a llenar con medio con 500 μ g/ml de G418 y se cultivan durante 7-10 días. A continuación, las células sin genes resistentes a G418 y las células del grupo de control negativo mueren todas. Una vez que se han cultivado lo suficiente las células seleccionadas del medio G418, se confirma una proteína EATP expresada en los medios usando un kit de ELISA para EPO (Boehringer Mannheim Corp.).

(4) Purificación de EATP expresada

Usando un anticuerpo monoclonal anti-EPO (R&D Inc.), se preparan resinas de afinidad para purificación del siguiente modo.

0,3 g de sefarosa activada-CNBr 4B se hinchan en HCl 1 mM durante 20 minutos y se cargan en una columna, seguido por lavado con HCl 1 mM. A continuación, la resina resultante se lava en 4 ml de solución tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,1M y NaCl 0,5M, pH 8,3) se transfiere a un tubo e inmediatamente se mezcla con un anticuerpo monoclonal anti-EPO en la solución tampón de acoplamiento (500 μ g/vial) y después se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. En este momento, el tubo se agita suficientemente. Después, el producto resultante se sustituye con un tampón de bloqueo (glicina 0,2M, pH 8,0) y se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. La resina resultante se lava secuencialmente con 6,5 ml de solución tampón de acoplamiento, 6,5 ml de solución de tampón acetato (ácido acético 0,1M, NaCl 0,5M, pH 4) y 6,5 ml de solución de tampón de acoplamiento. La resina preparada se empaqueta en una columna y después se somete a purificación del siguiente modo.

Las células se cultivan en un medio sin suero durante un día y después sólo el medio se concentra aproximadamente 5 veces usando un filtro de ultrafiltración, por ejemplo, Centriprep (con un corte de peso molecular nominal de 10.000) (Millipore Corp.). A continuación, las soluciones concentradas se cargan en una columna equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un caudal de aproximadamente 20 ml/h y se lavan de nuevo con PBS. Las proteínas diana se eluyen en una solución de tampón de elución (glicina 0,1M, pH 2,8) y después se titulan de inmediato con solución Tris 1 M para ajustar a un pH 7,5. La pureza de la EATP purificada es del 97% o superior, verificado mediante SDS-PAGE y tinción de plata (véase la Fig. 4).

(5) Medición de la actividad mediante bioensayo y análisis bioquímico

Las actividades biológicas de las EPO y EATP expresadas y purificadas adecuadamente se miden mediante bioensayo utilizando células de bazo de un ratón tratado con fenilhidrazina. El resultado muestra que la actividad de EATP es mayor a la de la EPO, lo que sugiere que la presencia de extremos carboxi añadidos en la EATP no inhibe la actividad de la EPO.

(6) Prueba farmacocinética

Con el fin de confirmar si los materiales candidato preparados en realidad poseen una semivida *in vivo* más prolongada, se realizan pruebas farmacocinéticas en ratones. Aquí, los materiales candidatos se administran por vía intravenosa a cuatro ratones a dosis de 20 unidades por cada ratón. Para evaluar el perfil de concentración en sangre, la sangre de los ratones se agrupa y la concentración de la sangre agrupada se mide usando un kit de EIA (Boehringer Mannheim Corp.). La prueba farmacocinética realizada en ratones muestra que el material candidato EATP posee una semivida mucho más prolongada que el material control EPO (véase la Fig. 5).

La presente invención además se ilustra en los siguientes ejemplos, que no deben malinterpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Adquisición de genes

El ADNc de la EPO se adquirió empleando una técnica RT-PCR convencional utilizando un kit RT-PCT Premix (Bioneer Corp., Corea), en el que se usaron los cebadores EP1 y EC2 complementarios a ambos extremos del ADNc de la EPO previamente preparados a partir de una biblioteca de ADNc del hígado embrionario humano (Invitrogen Corp.). Se realizaron 30 ciclos de reacciones de PCR en las condiciones de 35 segundos a 55°C (hibridación), 40 segundos a 72°C y 20 segundos a 94°C, que dieron el ADNc de la EPO. El ADNc de la EPO obtenido se clonó en un vector de clonación pGEM-T (Promega Corp.). En otras palabras, el producto de la PCR se eluyó a partir de agarosa al 1%, se ligó al pGEM-T, seguido por la transformación de *E. coli* NM522. Después de la incubación durante la noche en un medio sólido con X-gal/PTG en el que se ha frotado LB-Ampicilina, se aisló el ADN del plásmido de las colonias blancas y se hizo reaccionar con las enzimas de restricción *Sac I* y *Sac II* para seleccionar las colonias en cuyo interior tengan insertado el ADNc de la EPO. El vector obtenido -se denominó pGEM-EPO y su secuencia de bases se identificó para usar como molde en los siguientes procesos.

Los genes CTP modificados de una subunidad β de HCG se obtuvieron mediante síntesis artificial y PCR de autocebado. Los fragmentos génicos sintetizados fueron EA1, A2, A3 y A4.

Se tomó 1 μ l de cada uno de cuatro genes (50 pmol/ μ l) para someterlos a 15 ciclos de PCR usando un sistema Taq de alta fidelidad (Boehringer Mannheim Corp.) en las condiciones de 40 segundos a 55°C (hibridación), 40 segundos a 72°C y 20 segundos a 94°C. Los fragmentos génicos de aproximadamente 100 pb de tamaño se identificaron en un gel de agarosa al 1% (genes CTP modificados).

Estos genes codifican un péptido obtenido sustituyendo 4 residuos de Ser en las posiciones 121, 127, 132 y 138 entre 28 aminoácidos del extremo carboxilo de una subunidad β de HCG, con residuos de Ala (Fig. 1).

La PCR se realizó usando un molde de pGEMT-EPO y los cebadores EP1 y EC2, dando sólo genes de EPO. A continuación se realizaron 30 ciclos de PCR usando como moldes los genes de EPO y los genes CTP modificados obtenidos y usando los dejadores EP11 y EP22 por medio de un sistema Taq de alta fidelidad en las condiciones de 42 segundos a 57°C (hibridación), 60 segundos a 72°C y 20 segundos a 94°C. Por tanto, se obtuvieron aproximadamente 630 pb de fragmentos génicos fusionados (que se denominarán genes EATP). Estos genes se clonaron en pGEM-T usando el procedimiento mencionado anteriormente (que se denominará pGEM-EATP) y se identificaron sus secuencias.

Ejemplo 2

Construcción del vector de expresión pcDNA3.1-EATP

El vector pcDNA3.1 (Invitrogen) se usó como vector de expresión. Ambos extremos del gen EATP en el plásmido pGEMT-EATP poseen sitios de restricción *Hind III* y *BamH I* derivados de los cebadores EP11 y EP22.

El vector pcDNA3.1 y el obtenido pGEMT-EATP se trataron con las enzimas de restricción *Hind III* y *BamH I*. El pcDNA3.1 linealizado y el gen EATP se obtuvieron de un gel de agarosa usando un kit de elución Quiagen, seguido por unión, transformando de este modo *E. coli* NM522. Los plásmidos se aislaron de colonias resultantes de la incubación durante la noche en un medio sólido con LB-ampicilina y se trataron con las enzimas de restricción *Hind III* y *BamH I*. A continuación, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% sólo se seleccionaron las colonias que tenían insertado EATP. Los plásmidos resultantes se denominaron pcDNA3.1EATP (véase la Fig. 3).

Ejemplo 3

10 Transfección de células CHO y expresión de EATP

Células CHO (DG44) se cultivaron en una placa de 60 mm para preparar células confluentes 40-80% ($1-4 \times 10^5$ células/placa de 60 mm). Se mezclaron 3 μ l de un reactivo de superinfección (Boehringer Mannheim Corp.) y 97 μ l de medio (α -MEM con medio, sin suero y sin antibiótico) suficientemente y a la mezcla resultante se añaden aproximadamente 2 μ g de un plásmido pcDNA3.1-ADN EATP (más de 0,1 μ g/ μ l) y 0,2 μ g de un vector pLTRdhfr26 (ATCC37295) que contiene el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr) y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y después se añadieron a las células. Después de un día, los medios se sustituyeron con α -MEM sin medio (que contiene 500 μ g/ml de G418) con FBS al 10%. Las células se vuelven a llenar con medio con 500 μ g/ml de G418 y se cultivan durante 7-10 días. A continuación, las células sin genes resistentes a G418 y las células del grupo de control negativo murieron todas. Una vez que se han cultivado lo suficiente las células seleccionadas del medio G418, se confirmó una proteína EATP expresada en los medios usando un kit de ELISA para EPO (Boehringer Mannheim Corp.).

Ejemplo 4

25 Purificación de EATP expresado

Usando un anticuerpo monoclonal anti-EPO (R&D Inc.), se prepararon resinas de afinidad para purificación del siguiente modo.

0,3 g de sefarosa activada-CNBr 4B se hinchan en HCl 1 mM durante 20 minutos y se cargaron en una columna, seguido por lavado con HCl 1 mM. A continuación, la resina resultante se lavó en 4 ml de solución tampón de acoplamiento (NaHCO_3 0,1M y NaCl 0,5M, pH 8,3) se transfirió a un tubo e inmediatamente se mezcló con un anticuerpo monoclonal anti-EPO en la solución tampón de acoplamiento (500 μ g/vial) y después se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. En este momento, el tubo se agitó suficientemente. Después, el producto resultante se sustituyó con un tampón de bloqueo (glicina 0,1 M, pH 8,0) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto resultante se lavó secuencialmente con 6,5 ml de solución tampón de acoplamiento, 6,5 ml de solución de tampón acetato (ácido acético 0,1M, NaCl 0,5 M, pH 4) y 6,5 ml de solución de tampón de acoplamiento. La resina preparada se empaquetó en una columna y después se sometió a purificación del siguiente modo.

Las células se cultivaron en un medio sin suero durante un día y después sólo el medio se concentró aproximadamente 5 veces usando un filtro de ultrafiltración de Centriprep (con un corte de peso molecular nominal de 10.000) (Millipore Corp.). A continuación, las soluciones concentradas se cargaron en una columna equilibrada con PBS a un caudal de aproximadamente 20 ml/h y se lavaron de nuevo con PBS. Las proteínas diana se eluyeron en una solución de tampón de elución (glicina 0,1 M, pH 2,8) y después se titularon de inmediato con solución Tris 1 M para ajustar a un pH 7,5. La pureza de la EATP purificada es del 97% o superior, verificado mediante SDS-PAGE y tinción de plata (véase la Fig. 4).

50 Ejemplo 5

Medición de la actividad mediante bioensayo

A un ratón se administró fenilhidrazina una vez al día durante 2 días a la dosis de 60 mg/kg. Después de 3 días, del ratón se aisló un bazo agrandado y se pulverizó con un homogeneizador para obtener las células del bazo. Las células del bazo se diluyeron hasta una concentración de 6×10^6 células/ml y cada 100 μ l de la muestra diluida se transfirieron a una placa de 96 pocillos. A los respectivos pocillos se añadieron EPO estándar (0-500 mU/ml) y EPO y EATP expresadas (cada 100 mU/ml). A continuación, la placa se almacenó en un incubador de CO_2 mantenido a 37°C durante 22 horas. A cada pocillo se añadieron 50 μ l de dimetil- ^3H -timidina (20 μ Ci/ml). La placa resultante se hizo reaccionar además durante 2 horas y después las soluciones de la muestra de cada pocillo se adsorbieron en un filtro de vidrio (Nunc 1-73164). El filtro se lavó tres veces con solución salina y la radiactividad del filtro se midió usando un contador beta (β). Las mediciones mostraron que la actividad de EATP eran sustancialmente iguales o ligeramente superiores a la de la EPO, lo que sugiere que la presencia de extremos carboxilo añadidos en EATP no inhibe la actividad de la EPO.

Ejemplo 6

Prueba farmacocinética

5 Con el fin de confirmar si los materiales candidatos preparados en realidad poseen una semivida *in vivo* más prolongada, se realizaron pruebas farmacocinéticas en ratones. Aquí, la proteína de fusión purificada mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 se administró por vía intravenosa a cuatro ratones, a dosis de 20 unidades para cada ratón. Para evaluar el perfil de concentración en sangre, la sangre de los ratones se acumuló a intervalos de tiempo regulares, es decir, cada 30 minutos al principio y cada 2 horas después de 2 horas, y la concentración de la sangre
10 acumulada se determinó usando un kit de EIA (Boehringer Mannheim). El resultado de la prueba farmacocinética se muestra en la Fig. 5. Como se muestra en la Fig. 5, el material candidato EATP poseía una semivida mucho más prolongada (más de 2,5 veces más prolongada) que el material control EPO.

15 De acuerdo con la presente invención, la actividad *in vivo* de la EPO se puede potenciar incrementando la semivida *in vivo* mientras que conserva la actividad intrínseca de la EPO con su propio aminoácido, es decir sin incrementar el contenido en cadenas de azúcar de la EPO.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una proteína de fusión que comprende eritropoyetina humana (EPO) que posee un extremo carboxi y un mutante unido al extremo carboxi, dicho mutante posee una secuencia de aminoácidos desde la posición 7 a la posición 34 en la SEC ID N° 1 con de una a cuatro sustituciones de aminoácidos en las posiciones 10, 16, 21 y 27 de la SEC ID N° 1.

10 2. Un proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que el mutante posee residuos de serina en las posiciones 10, 16, 21 y 27 de la SEC ID N° 1 sustituidos con alanina o glicina.

3. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2.

15 4. Un procedimiento para preparar una proteína de fusión que posee una actividad EPO *in vivo* potenciada que comprende:

Cultivar una línea celular transformada transfeccionada con un vector recombinante que contiene el ácido nucleico según la reivindicación 3.

20 5. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2 junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes fisiológicamente tolerables.

6. Proteína de fusión como se define en las reivindicaciones 1 ó 2 para usar como medicamento.

25 7. Proteínas de fusión como se define en las reivindicaciones 1 ó 2 para usar en el tratamiento de la anemia.

8. Uso de una proteína de fusión como se define en las reivindicaciones 1 ó 2 para la preparación de un medicamento para tratar la anemia.

Fig. 1.

1 10
TGC GGT TGC GGC AAG GGC CCT CCC GGC GTT GCA AGC CCA GGC
Ser Ser Ser Ala Lys Ala Pro Pro Pro Ala Leu Pro Ser Pro Ala
20 27 28
CGA CTC CCG GGG CCC GGC GAC ACC CCG ATC CTC CCA GAA TAA
Arg Leu Pro Gly pro Ala Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

FIG 2

ATG GGG GTG CAG GAA TGT CCT GGC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC
 MET Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser

CTG CTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC GCC CCA CCA
 Leu Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro

CSC CTC ATC TGT GAG AGC CBA GTC CTG BAG AGG TAC CTC TTG GAG
 Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu

GCG AAG BAG GCC GAG AAT ATC ACG ACG GGC TGT GCT GAA CAC TGC
 Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys

AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACT GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC
 Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe

TAT GCG TGG AAG AGG ATG GAG GTC GGG CAG CAG GCG GTA GAA GTC
 Tyr Ala Trp Lys Arg MET Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val

TGG CAG GGC CTG GCC CTG CTG TCG GAA GCT GTC CTG CCG GGC CAG
 Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln

GCG CTG TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG CAG CTG
 Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu

CAT GTG GAT AAA GGC GTC AGT GGC CTT CSC AGC CTC ACC ACT CTG
 His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu

CTT CCG GCT CTG GGA GGC CAG AAG GAA GGC ATC TCC CCT CCA GAT
 Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp

GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CBA ACA ATC ACT GCT GAC ACT TTC
 Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe

CSC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC CCG GGA AAG CTG
 Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu

AAG CTG TAC ACA GGG GAG GGC TCC AGG ACA GGG GAC TCC GCT TCC
 Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Ser Ser Ser

GCG AAG GCC CCT CCG GCC GCG CTT CCA AGC CCA GGC CGA CTC CCG
 Ala Lys Ala Pro Pro Pro Ala Leu Pro Ser Pro Ala Arg Leu Pro

GGG GCG GCC GAC ACC CCG ATC CTC CCA CAA TAA
 Gly pro Ala Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

Fig. 3

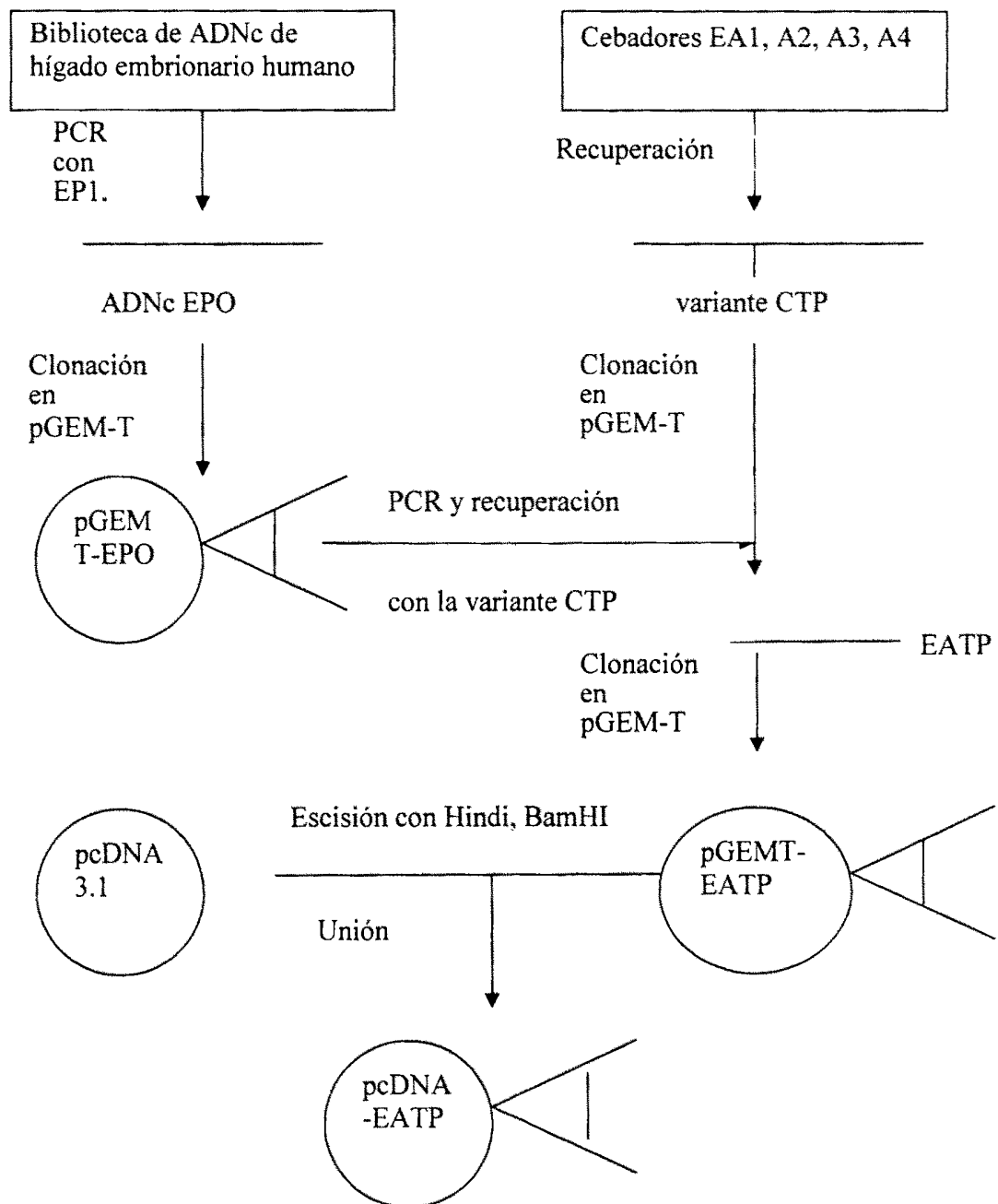


Fig 4.

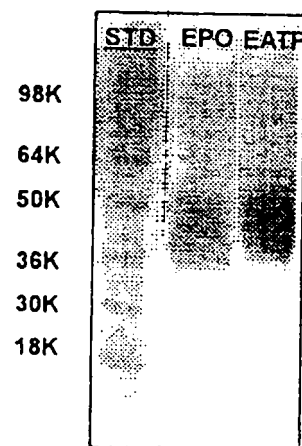
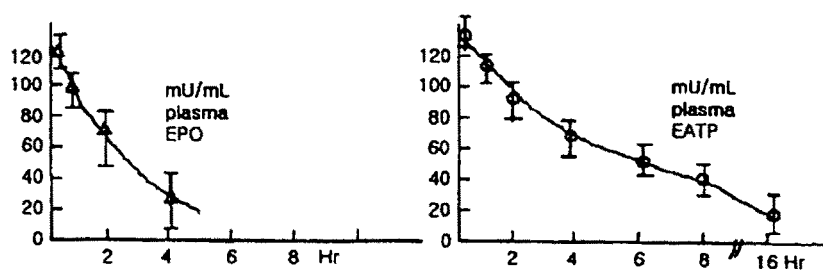


Fig. 5.



ES 2 280 487 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cheil Jedang Corporation

<120> Proteína de fusión que posee una actividad *in vivo* de eritropoyetina potenciada

<130> OV017299

<150> KR 10-2001-75994

<151> 2001-12-03

<160> 10

<170> Kopatentin 1.71

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(34)

<223> Aminoácidos en las posiciones de 112 a 145 de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (HCG)

<400> 1

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30

Pro Gln

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión (EATP) de eritropoyetina (EPO) y una variante del péptido carboxi terminal (ATP) de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (HCG)

<400> 2

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

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

ES 2 280 487 T3

	Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu	
	35 40 45	
5	Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu	
	50 55 60	
	Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg	
	65 70 75 80	
10	Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu	
	85 90 95	
	Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser	
	100 105 110	
15	Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly	
	115 120 125	
	Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu	
	130 135 140	
20	Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile	
	145 150 155 160	
	Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu	
	165 170 175	
25	Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp	
	180 185 190	
	Ser Ser Ser Ala Lys Ala Pro Pro Pro Ala Leu Pro Ser Pro Ala Arg	
	195 200 205	
30	Leu Pro Gly Pro Ala Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln	
	210 215 220	
35	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EP1 que posee la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia terminal del ADNc de la	
45	EPO	
	<400> 3	
50	atggggcac gaatgtcctg cctggctgg	29
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EC2 que posee la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia terminal del ADNc de la	
60	EPO	
	<400> 4	
65	gtcccctgtc ctgcaggcct	20
	<210> 5	

ES 2 280 487 T3

	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Variante del fragmento génico EA1 CTP de la subunidad beta de HCG	
	<400> 5	
10	aggggaggc tgcaggacag gggactcctc ttcg	35
	<210> 6	
15	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Variante del fragmento génico A2 CTP de la subunidad beta de HCG	
	<400> 6	
25	ggaagggcgg ggggaggggc cttggcggaa gagga	35
	<210> 7	
30	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Variante del fragmento génico A3 CTP de la subunidad beta de HCG	
	<400> 7	
40	ccgcccttcc aagcccagcc cgactcccgg ggccc	35
	<210> 8	
	<211> 35	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Variante del fragmento génico A4 CTP de la subunidad beta de HCG	
50	<400> 8	
55	ttattgtggg aggatcgggg tgctggcggg ccccg	35
	<210> 9	
	<211> 25	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EP11 para PCR para obtener el gen de fusión deseado EATP	
65		

ES 2 280 487 T3

<400> 9		
	taagcttatg ggggtgcacg aatgt	25
5	<210> 10	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador EP22 para PCR para obtener el gen de fusión deseado EATP	
15	<400> 10	
	tggatcctta ttgtgggagg atcggggt	28
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		