



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 418**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)	C12N 15/14 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)	C07K 14/765 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)	A61K 38/27 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)	C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05077642 .6**

96 Fecha de presentación : **19.12.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **1681304**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54 Título: **Proteínas de fusión recombinantes de la hormona de crecimiento y la albúmina de suero.**

30 Prioridad: **30.12.1995 GB 9526733**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **Novozymes Biopharma UK Limited**
Castle Court 59, Castle Boulevard
Nottingham NG7 1FD, GB

72 Inventor/es: **Ballance, David, J.**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 318 418 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

Proteínas de fusión recombinantes de la hormona de crecimiento y la albúmina de suero.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con proteínas recombinantes de fusión, una hormona de crecimiento (GH), una albúmina de suero y a la producción de proteínas en levadura.

10 **Antecedentes de la invención**

La albúmina de suero humano (HSA) es una proteína de 585 aminoácidos, que es responsable de una proporción significativa de la presión de ósmotica de suero y también funciona como un portador de ligandos endógenos y exógenos. Actualmente, HSA es producido para uso clínico desde extracciones de sangre humano. La producción de HA de recombinante (rHA) en microorganismos ha sido descubierto en EP 330 451 y EP 361 991.

El papel de albúmina como una molécula portadora y su naturaleza inerte son las propiedades deseables para ser usado como un estabilizador y transportador de polipéptidos. El uso de albúmina como un componente de una proteína de fusión para otras proteínas estabilizadoras ha sido descubierto en WO 93/15199, WO 93/15200, y EP 413 622. El uso de fragmentos N-terminal de HSA para fusiones de polipéptidos también ha sido descubierto (EP 399 666). La fusión para dichos polipéptidos es lograda por manipulación genética, de forma que el ADN que codifica para HSA, o un fragmento de ella, es unido al ADN que codifica para dicho polipéptido. Un hospedero apropiado es luego transformado o transfectado con la secuencia del nucleótido fusionado, tal arreglo sobre un plásmido apropiado para expresar un polipéptido de fusión. Nomura y col. (1995) intentó expresar la apolipoproteína E humana en *S. cerevisiae* como una proteína de fusión con HSA o fragmentos de HSA, usando una pre-secuencia de HSA por secreción directa. Mientras la fusión para HSA a longitud completa resultó en la secreción de niveles bajos de la proteína en el medio (se cosecha máximo 6.3 mg/L), la fusión para HSA (1-198) ó HSA (1-390) no resultó en la secreción en el medio.

La hormona de crecimiento humana (examinada por Strobl y Thomas, 1994) consta de un polipéptido simple de 191 aminoácidos, internamente entrelazado por dos puentes disulfuro. Dos moléculas de receptor hGH (*Hormona de crecimiento humano, siglas en su expresión inglesa*) obligan que cada molécula de hGH facilite la señal de transducción (Cunningham et al., 1991; de Vos et al., 1992). El C-terminal de la molécula de hGH está involucrado en la unión de primera molécula del receptor, pero en la extensión del N-terminal no es conocido que este involucrado en la unión con el receptor. La hormona es segregada de la glándula pituitaria anterior bajo el control de hipotálamo, y es responsable el N-terminal en un amplio rango de los efectos de promoción del crecimiento en el cuerpo. Clínicamente, el hGH es usado en el tratamiento del enanismo de hipopituitaria, la insuficiencia renal crónica en la infancia, fracturas de hueso y quemaduras. Los métodos en curso para la producción de hGH para uso terapéutico son por la extracción de la glándula pituitaria humana, por expresión en *Escherichia coli* recombinante como fue descubierto en EP 127 305 (Genentech) o en cultivos de células de mamíferos (Zeisel et al., 1992).

Además, la hGH ha sido expresada intracelularmente en levadura (Tokunaga et al., 1985) y este organismo puede proporcionar medios alternativos de la producción como fue descubierto en EP 60 057 (Genentech). Tsiomenko y col. (1994) reporta sobre el papel de la secuencia de prepro de MF α -1 de la levadura en la secreción de hGH. El adjunto de la secuencia pre-pro para el gene de hGH resultó en la acumulación de hGH en el periplasma y en las vacuolas, mientras el adjunto de la parte *pro* de hGH resultó en la expresión de un precursor no glicosilado localizado dentro de la célula. Solamente cuando ambas partes de la secuencia *leader* fueron fijadas al gen de hGH fue secretado la hGH en el medio de cultivo. Otras señales de secreción (pre-secuencias) fueron también menos efectivas que la secuencia *pro* usada y obtenida de la levadura, sugiriendo que tal secuencia *pro* es usada como crítica en la secreción eficiente de la hGH en la levadura.

En los seres humanos, la hGH es secretada a la sangre en pulsos, y en la circulación tiene un tiempo de vida media menor de 20 minutos (Haffner et al., 1994). La eliminación de la hormona es principalmente vía el metabolismo en el hígado y los riñones y es más rápido en los adultos que en los niños (Kearns et al., 1991). El tratamiento para la deficiencia de hGH dura de 6 a 24 meses, durante la que se administra la hGH tres veces por semanas intramuscularmente o diariamente en general subcutáneamente. Tal régimen de administración frecuente es necesario debido a la corta vida de la molécula.

Poznansk et al. (1988) incrementan el tiempo de vida de la hormona de crecimiento porcina por la conjugación con albúmina de suero porcina o humana (HSA) para formar un conjugado relativamente grande de aproximadamente 180 kD. La reacción química usando el reactivo glutaraldehído resultó por término medio, en dos moléculas de albúmina complejas con seis moléculas de hormona de crecimiento. El conjugado de 180 kD resultante se observó que tiene un tiempo de vida prolongada en la circulación de ratas de 2 a 3 horas, comparado con los 5 minutos para la hormona de crecimiento no conjugada. El ensayo de actividad muestra que el conjugado retenido completamente conserva la actividad completa, y posiblemente aumenta la actividad *in vitro*, pero es inactivo *in vivo*.

Sleep et al. (1990) Biotechnology, 8, 42-46 presentan la secreción de la albúmina humana a partir de *S. cerevisiae* usando varias secuencias líder.

La EP 387 319 (Delta biotechnology Ltd) presenta la expresión en *S. cerevisiae* de proteínas de fusión que contienen albúmina usando la secuencia líder factor- α y el terminador y promotor PGK.

Hiramatsu et al. (1990) Appl. Env. Microbiol. 56, 2125-2132 presentan el uso de el pre-pro-péptido *Mucor pusillus* para proporcionar la secreción de la hormona de crecimiento en *S. cerevisiae*.

Resumen de la invención

La invención se relaciona con polinucleótidos como se definen en la Reivindicación 1. Éstos codifican proteínas formadas por la fusión de una molécula de albúmina, o variantes o fragmentos de ella, una molécula de hormona de crecimiento o variantes o fragmentos de ella, proteínas de fusión que tienen un aumento en el tiempo de vida circulatorio sobre la hormona de crecimiento no fusionada. Por conveniencia, haremos referencia a albúmina humana (HA) y a hormona de crecimiento humana (hGH), pero la albúmina y las hormonas de crecimiento de otros vertebrados son incluidas también. Preferentemente, la proteína de fusión comprende HA, o una variante o fragmento de ella, como la parte N-terminal, con hGH o una variante o fragmento de ella, como la parte C-terminal para minimizar cualquier efectos en contra posibles sobre la unión del receptor. Por otra parte, una proteína de fusión que comprende HA, o una variante o fragmento de ella, como la parte C-terminal, con hGH o una variante o fragmento de ella como la parte N-terminal, podría ser también capaz de una señal de transducción. En general, el polipéptido tiene solamente una región derivada HA y una región derivada GH.

Además, las proteínas de fusión de la invención podrían incluir un péptido de enlace entre las dos partes unidas para proporcionar una separación física más grande entre los dos mitades y maximizar la disponibilidad de la parte de hGH, para unir el receptor de hGH. El péptido enlace podría constar de aminoácidos de forma que es flexible o más rígido.

Nosotros hemos descubierto que los polipéptidos de la invención son significativamente más estables en solución que la hGH. El último rápidamente se convierte inactivos cuando se guarda en solución a 4°C por más de un mes. La hGH actualmente comercializable se vende como un polvo liofilizado.

Convenientemente, los polipéptidos de fusión son producidos como moléculas recombinantes por secreción desde levadura, microorganismos como bacterias línea de células de humanos o levadura. Preferentemente, el polipéptido es secretado del hospedero. Hemos descubierto que uniendo la secuencia de codificación de la hGH a la secuencia de codificación de HA, al extremo 5' o al 3', es posible secretar la proteína de fusión desde la levadura sin el requerimiento de una secuencia *pro* derivada de la levadura. Esto fue sorprendente, ya que otros autores han descubierto que la secuencia *pro* derivada de levadura es necesaria para la secreción eficiente de la hGH en levadura. Por ejemplo, *Hiramatsu y col.* (1990, 1991) descubrió que la parte N-terminal de la secuencia *pro* *Mucor pusillus rennin* fue importante. Los otros autores, usan la señal de MF α -1, que tienen siempre incluido la secuencia *pro* de MF α -1 cuando se secreta la hGH. La secuencia *pro* se cree que ayuda al plegamiento de la hGH cuando actúa como un *chaperone* intramolecular. La presente invención muestra que la HA o los fragmentos de HA pueden desempeñar una función similar.

Por tanto, una realización particular de la invención consta de una construcción de ADN que codifica una secuencia señal efectiva para direccionar la secreción en levadura, particularmente una secuencia señal derivada de la levadura (especialmente una que es homologa al hospedero de la levadura), y la molécula fusionada del primer aspecto de esta invención, siendo la secuencia *pro* no derivada de la levadura entre la señal y el polipéptido maduro.

La señal invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* es un ejemplo preferido de una señal derivada de levadura.

Los conjugados del tipo preparado por *Poznansky et al.* (1988), en el que los polipéptidos preparados por separado son unidos por acoplamiento químico, no se contemplan.

La albúmina o la hGH podrían ser una variante de HSA/rHA normal (llamada en lo adelante como "HA") o hGH, respectivamente. Por "Variantes" se incluyen las inserciones, las delecciones y las sustituciones, ya sean conservadoras o no conservadoras, donde no se alteran considerablemente los cambios en una o más presencia de tumores, convenientemente las propiedades de unión al ligando y no inmunogenicidad de la albúmina o, en el caso de la hGH, es su no inmunogenicidad y la capacidad de ligar y activar el receptor de hGH. En lo particular, incluimos variantes polimórficas que ocurren naturalmente de la albúmina humana y fragmentos de albúmina humana, por ejemplo esos fragmentos revelan en EP 322 094 (concretamente HA (1-n), donde n es 369 hasta 419). La albúmina o la hormona de crecimiento pueden ser de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo humano, vaca, ovejas, cerdo, gallina o salmonas. La albúmina y las partes de la GH de la fusión pueden ser de animales diferentes.

Por "sustituciones conservadoras" se entienden los intercambios dentro de los grupos tales como Gly, Ala; Val, He, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. La variante de GH tendrá al menos 75% (preferentemente al menos 80%, 90%, 95% ó 99%) de la secuencia idéntica con hormona de crecimiento humana en cuanto la excepción se hace para las delecciones y las inserciones como se acostumbra en el estado de la técnica. Una variante de HA tendrá secuencia de identificación al menos el 75% de los dos dominios enteros de HA, por ejemplo de dominios 1 + 2 (1-387), 2 + 3 (195-585) ó 1 + 3 (1-194, + 388-585). Cada dominio en sí se hace de dos subdominios homologos nombrados 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, concretamente con un subdominio flexible de regiones de enlace que consta de los residuos Lys106 hasta Glu199, Glu292 hasta Val315 y Glu492 hasta Ala511.

ES 2 318 418 T3

La variante de hGH que debe tener actividad de GH, y de al menos 150, 180 ó 191 aminoácidos preferentemente manteniendo sus cisteínas para ambos puentes disulfuro internos.

Las moléculas fusionadas de la invención en general tienen un peso molecular de al menos 100 kD, por ejemplo menor que 90 kD o 70 kD. Son por lo tanto mucho más pequeñas que los conjugados de 180 kD de (Poznansky *et al.* (referidos arriba), que eran inactivo *in vivo*.

La mayoría entra dentro de un rango de peso molecular de 60-90 kD.

Un segundo aspecto principal de la invención es proporcionar una levadura transformada para expresar una proteína de fusión.

Además de las células del hospedero transformadas en ella misma, la presente invención también considera un cultivo de esas células, preferentemente un cultivo de monoclonales (clonalmente homogéneo), o un cultivo obtenido desde un cultivo de monoclonal, en un medio nutriente. Especialmente si el polipéptido se secreta, el medio entonces contendrá el polipéptido, con las células, o sin las células, si ha sido filtrado o centrifugado.

Muchos sistemas de expresión son conocidos, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *bacilo subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*, hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus*), células de planta, células de animal y células de insecto.

La proteína deseada se produce de manera convencional, por ejemplo desde una secuencia de codificación que es insertada en el cromosoma del hospedero o en un plásmido libre.

Las levaduras son transformadas con una secuencia de codificación para la proteína deseada en cualquiera de las maneras acostumbradas, por ejemplo electroporación. Los métodos para la transformación de la levadura por electroporación son revelados en Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182.

Las células con éxito transformadas, es decir las células que contienen una construcción de ADN de la invención actual, puede ser identificado por las técnicas conocidas. Por ejemplo, las células que resultan con la introducción de una construcción de expresión pueden ser cultivadas para producir el polipéptido deseado. Las células pueden ser cosechadas y lisadas y su contenido de ADN se examina la presencia del ADN usando un método tales como describe Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 ó Berent y col. (1985) *Biotech.* 3, 208. Alternadamente, la presencia de la proteína en el sobrenadante puede ser detectado usando anticuerpos.

Los vectores de plásmido de levadura útiles incluyen *pRS403-406* y *pRS413-416* y están en general disponible desde *Stratagene Cloning Systems*, La Jolla, CA 92037, USA. Los plásmidos *pRS403*, *pRS404*, *pRS405* y *pRS406* son plásmidos integrados a la levadura (Yips) y se incorporan marcadores de selección de la levadura *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*. El *pRS413-416* son de Yeast Centromere (YCps).

Una variedad de métodos han sido desarrollados para operar la unión del ADN a vectores de vía complementaria y cohesiva a terminales. Por ejemplo la región de homopolímero complementario puede ser adicionando al segmento de ADN e insertar al vector de ADN. El vector y el segmento de ADN son unidos por enlaces de hidrógeno entre las colas de homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Los enlazadores sintéticos que contienen uno ó más sitios de restricción proporcionan un método alternativo de unión al segmento de ADN para los vectores. El segmento de ADN, generado por la digestión de restricción de endonucleasa, se trata con un bacteriográfico de ADN T4 polimerasa o polimerasa I de ADN *E. coli*, las enzimas que se remueven salen del sitio, extremo terminal de hebra simple 3' con su actividad exonucleolíticas 3'-5' y completa recesa su actividad polimerasa en el extremo 3'.

La combinación de estas actividades genera los segmentos de ADN punta y extremo. Los segmentos punta - extremo son incubados y luego con un exceso molar grande de enlace de las moléculas en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la ligación de moléculas de ADN punta - extremo, como ADN ligasa bacteriofago T4. Por lo tanto, los productos de la reacción son los segmentos de ADN que traen secuencias de enlaces poliméricas a sus extremos. Estos segmentos de ADN son cortados luego con enzima de restricción apropiada y ligados a un vector de expresión que ha sido cortado con una enzima que produce extremos compatibles con esos segmentos de ADN.

Enlaces sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasas de restricción están comercialmente disponibles de varias fuentes incluyendo *Internacional Biotechnologies Inc*, New Haven, CN, USA.

Una forma deseable de modificar el ADN según la invención, por ejemplo, las variantes de HA son y serán preparadas, usando la reacción en cadena de polimerasa como se revela por Saiki *et al.* en *Science* 239, 487-491 (1988). En este método el ADN será amplificado enzimáticamente y está flanqueado por dos plantillas de oligonucleótido específicas en la que ellos mismos se incluyen en el ADN amplificado. Dicha plantilla específica podría contener sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción que pueden ser usados para reproducir vectores de expresión que usando métodos conocidos en el estado de la técnica.

Los ejemplos de géneros de levadura que se contemplan y son útiles en la práctica de la presente invención como hospederos para expresar las proteínas de fusión son *Pichia* (*Hansenula*), *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Botryosaccharomyces*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, y semejantes. Los géneros preferidos son aquellos seleccionados del grupo que consta de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulaspora*. Ejemplos de *Saccharomyces* spp. son *S. cerevisiae*, *S. italicus* y *S. rouxii*. Ejemplos de *Kluyveromyces* spp. son *K. fragilis*, *K. lactis* y *K. marxianus*. Una especie de *Torulaspora* apropiada es *T. Delbrueckii*. Ejemplos de *Pichia* (*Hansenula*) spp son *P. Angusta* (antes *H. polimorpha*), *P. Anomala* (antes *H. anomala*) y *P. Pastoris*.

Los métodos para la transformación de *S. cerevisiae* son enseñados en general en EP 251 744, EP 258 067 y WO 90/01063, todas ellas incluidas aquí en las referencias.

Los promotores apropiados para *S. cerevisiae* incluyen aquellos relacionados con el gen *PGK1*, gen *GAL1* o *GAL10*, *CYC1*, *PHO5*, *TRP1*, *ADH1*, *ADH2*, los genes para gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, hexoquinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructoquinasa, fosfato triosa isomerasa, fosfoglucoquinasa, glucoquinasa, factor α -mating feromona, factor a-mating feromona, el promotor *PRB1*, el promotor *GUT2*, el promotor *GPD1*, y los promotores híbridos que involucran híbridos de las partes de las regiones reguladoras de 5' con partes de las regiones reguladoras de 5' de otros promotores o con sitios de activación aguas arriba (por ejemplo el promotor de EP-A-258 067).

Los promotores regulables convenientes para el uso en *Schizosaccharomyces pombe* son el promotor del gen represor de tiamina desde el gen *mtt* como se describe por Maundrell (1990) *J. Biol Chem.* 265, 10857-10864 y el promotor del gen *fbpl* represor de glucosa como describe Hoffman & Winston (1990) *Genetics* 124, 807-816.

Los métodos de transformación de *Pichia* para la expresión de genes foráneos son enseñados, por ejemplo, Cregg et al. (1993), y varias patentes de Phillips (por ejemplo US 4 857 467, incorporada esta en la referencia), y el equipo de expresión de *Pichia* comercialmente disponible son Invitrogen BV, Leek, Netherlands and Invitrogen Corp., San Diego, California. Los promotores apropiados incluyen *AOX1* y *AOX2*.

Gleeson et al. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 3459-3465 incluye la información sobre los vectores de *Hansenula*, transformación y los promotores apropiados siendo *MOX1* y *FMD1*; mientras que en EP 361 991, Fleer et al. (1991) y otras publicaciones de Rhone-Poulenc Rorer enseñan cómo expresar proteínas foráneas en *Kluyveromyces* spp., siendo un promotor apropiado *PGK1*.

La señal de terminación de transcripción es preferentemente la secuencia de flanqueo 3' de un gen eucariota que contiene las señales propias para la terminación de la transcripción y poliadenilación 3'. Las secuencias de flanqueo apropiadas podrían ser aquellos genes unidos a la secuencia de control de la expresión usada naturalmente, por ejemplo, podría corresponderse con la del promotor. Por otra parte, podrían ser diferentes y en tal caso la señal de terminación del gen *ADH1* de *S. cerevisiae* es preferida.

La proteína de fusión deseada puede ser expresada inicialmente con una secuencia guía efectiva de secreción, que puede ser cualquier guía efectivo en la levadura escogida. Guías útiles de *S. cerevisiae* incluyen desde el polipéptido del factor de apareamiento (MF α -1) y el guía híbrido de la EP-A-387 319. Tales guías (o señales) son cortados por la levadura antes de que la albúmina madura sea liberada en el entorno circundante. Además tales guías incluyen la invertasa *S. cerevisiae* (SUC2) que reveló en JP 62-096086 (conferida como 91/036516), ácido fosfatasa (PHO5), la pre-secuencia de MF α -1, β -glucanasa (BGL2) y toxina asesina; glucoamilasa II de *S. diastaticus*; α -galactosidasa de *S. carlsbergensis* (MEL1); toxina asesina de *K. lactis*; y glucoamilasa de *Candida*.

La proteína de fusión de la invención o una formulación de ella misma puede ser administrada por cualquier método convencional incluyendo la parenteral (por ejemplo subcutánea o intramuscular) la inyección o la infusión intravenosa. El tratamiento podría constar de una sola dosis o una pluralidad de dosis durante un período de tiempo.

Mientras es posible que una proteína de fusión de la invención se administre sola, es preferible presentarla como una formulación farmacéutica, con uno o más portadores aceptables. El portador (s) debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la proteína de fusión y no nocivo a los receptores de ella. Típicamente, los portadores son el agua o salina que será estéril y libre de pirógenos. La formulación debe ser no inmunogénica; formulaciones tipo vacuna que involucran adyuvantes no son consideradas.

Las formulaciones pueden ser presentadas en la forma de dosis unitaria convenientemente y pueden ser preparados por alguno de los métodos conocidos en el arte de farmacia. Tales métodos incluyen el paso de traer la proteína de fusión en la asociación con el portador que constituye uno ó más ingredientes de accesorios. En general las formulaciones son preparadas uniformemente e íntimamente traen en asociación el ingrediente activo con el portador líquidos o sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dar forma al producto.

Las formulaciones apropiadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas ó no acuosas de inyección estériles que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que dan la formulación isotónica con la sangre del receptor futuro; y suspensiones estériles acuosas y no acuosa que pueden incluir agentes suspendi-

dos y agentes espesante. Las formulaciones pueden ser presentadas en dosis unitaria o contenedores multidosis, por ejemplo ampolletas selladas y viales, pueden ser almacenadas en una condición liofilizada que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo el agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Soluciones de inyección extenporaneas y suspensiones pueden ser preparadas como polvos estériles.

Las formulaciones de dosis unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o unidad la subdosis diaria o una fracción apropiada de ella misma, de un ingrediente activo.

Las proteínas de fusión de la invención pueden ser usadas en el tratamiento de cualquier condición en la que la hormona de crecimiento es mostrada por ejemplo la deficiencia de hormona de crecimiento aislada, panhipopituitarismo, irradiación craneal (por ejemplo en el tratamiento de la leucemia o los tumores cerebrales), el síndrome de Turner, el síndrome de Down, el retardo de crecimiento intrauterino, la deficiencia de crecimiento idiopático, la insuficiencia renal crónica, acondroplasia, varios trastornos catabólicos como infertilidad del sexo femenino. También pueden ser usados en la estimulación del crecimiento, y/o aumento de la proporción de carne sin grasa, en animales de granja como vacas, ovejas, cabras y cerdos.

La proteína de fusión puede ser administrada junto con factores de crecimiento como insulina (IGF-I).

La dosis puede ser calculada sobre la base de la potencia relativa de la proteína de fusión en comparación con la potencia de la hGH, mientras tomamos en cuentas la prolongación del tiempo de vida en suero de las proteínas de fusión comparadas con la hGH nativa. La hormona de crecimiento es administrada típicamente de 0,3 a 30,0 IU/kg/semana, por ejemplo 0,9 a 12,0 IU/kg/semana, en tres o siete dosis divididas por un año ó más. En una proteína de fusión que consta de la HA fusionada completa unida a la GH completa, la dosis equivalente en término de unidades, representa un peso mayor pero la frecuencia de dosis puede ser reducida, por ejemplo a dos veces a la semana, una vez a la semana ó menos.

Los ejemplos preferidos de la invención serán descritos en forma de ejemplo con las referencias a las figuras que lo acompañan, en las cuales:

Figura 1 muestra la secuencia de cADN de la hormona de crecimiento humana, codificando para la hGH madura;

Figura 2 muestra un mapa de enzima de restricción del pHGH1;

Figura 3 muestra un mapa de enzima de restricción de pBST (+) y la secuencia de ADN del policonector;

Figura 4 muestra la construcción de pHGH12;

Figura 5 muestra la construcción de pHGH16;

Figura 6 muestra la secuencia de ADNc de HSA, más particularmente la región que codifica para la proteína madura;

Figura 7 muestra la construcción de pHGH14;

Figura 8 muestra la construcción de pHGH38;

Figura 9 muestra la construcción de pHGH31;

Figura 10 muestra la construcción de pHGH58 o pHGH59 (ejemplo 7);

Figura 11 es un esquema para formular construir separadores que tienen fusiones (ejemplo 7); y

Figura 12 muestra los resultados de un estudio farmacocinético mostrando que la eliminación de rHA-hGH marcada con I comparándola con la inyección IV en ratas. Los datos son de dos ratas en cada grupo, e incluyen la radiactividad total y la radiactividad que podían ser precipitada por TCA, es decir que esta relacionada con la proteína preferentemente como ¹²⁵I libre. El período de vida calculado para la hGH es aproximadamente 6 minutos, comparado con los aproximadamente 60 minutos para la proteína de fusión de rHA - hGH. Ver ejemplo 3.

■ - hGH (conteo total)

■ - hGH (conteo TCA precipitado)

▼ - rHA-hGH (conteo total)

▲ - rHA-hGH (conteo TCA precipitado).

Descripción detallada de la invención

Todos los procedimientos de ADN recombinante usados como se describe en Sambrook y col. (1989) a menos de otra manera por lo demás. Las secuencias de ADN que codifican HSA fueron obtenidas desde el ADNc revelado en la EP 201 239.

Ejemplo 1

Clonación del ADNc de hGH

El ADNc de la hGH fue obtenido de una librería de ADNc de glándula pituitaria humano (número de catálogo HL1097v, *Clontech Laboratories, Inc*) por la amplificación de PCR. Dos oligonucleótidos apropiados para la amplificación de PCR del ADNc de hGH, HGH1 y HGH2, fueron sintetizados usando un *Applied Biosystems 380B Oligonucleotide Synthesizer*.

HGH1: 5' - CCCAAGAATTCCCTTATCCAGGC - 3'

HGH2: 5' - GGGAAGCTTAGAAGCCACAGGATCCCTCCACAG - 3'

Las HGH1 y HGH2 son diferidos de la parte equivalente de la secuencia de ADNc de la hGH (Figura 1, *Martial et al.*, 1979) por dos y tres nucleótidos, respectivamente, de forma que después de la amplificación de PCR a un sitio de *EcoRI* se introduce en el extremo 5' del ADNc y un sitio de *BamHI* sería introducido en el extremo 3' del ADNc. Además, la HGH2 contenía un sitio *HindIII* inmediatamente aguas abajo de la secuencia de la hGH.

La amplificación de PCR usando un *Perkin-Elmer-Cetus Thermal Cycler 9600 and a Perkin-Elmer-Cetus PCR kit*, fue llevada a cabo usando una plantilla de ADN de una sola hebra aislada desde partículas de fago de una librería de ADNc de la siguiente manera: 10 μ L de partículas de fago fueron rotas por la adición de 10 μ L de tampón de ruptura para fago (280 μ g/mL de proteína k en tampón TE) y la incubación a 55°C durante 15 minutos seguido por 85°C por 15 minutos. Después de la incubación de 1 minuto sobre hielo, debris de fago fue comprimido por centrifugación a 14,000 rpm durante 3 minutos. La mezcla de PCR conteniendo 6 μ L de esta plantilla de ADN, 0,1 μ M de cada plantilla y 200 μ M de cada deoxiribonucleótido. El PCR fue llevado a cabo por 30 ciclos, desnaturalizando a 94°C por 30 s, y endureciendo a 65°C por 30 s y extendiendo a 72°C por 30 s, incrementando el tiempo de extensión por 1 s por ciclo. El análisis de la reacción por electroforesis en gel muestra un solo producto con el tamaño esperado (589 pares de bases).

El producto de PCR fue purificado usando como *Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega Corp)* y luego digerido con *EcoRI* y el *Hind III* después de la purificación posterior del fragmento *EcoRI* - *HindIII* por gel de electroforesis, el producto fue clonado en pUC19 (*GIBCO BRL*) digerido con *EcoRI* e *HindIII*, para dar pHGH1 (Figura 2). Secuencia de ADN de la región *EcoRI* - *HindIII* muestra que el producto de PCR era idéntico a la secuencia de la hGH (*Martial y col.*, 1979), excepto en los extremos 5' y 3', donde los sitios de *EcoRI* y *BamHI* son introducidos, respectivamente.

Ejemplo 2

Expresión del ADNc de hGH

La secuencia del polilinker del fagomidio pBluescribe (+) (*Stratagene*) fue reemplazado insertando un oligonucleótido de enlace, constituido alineación de dos oligonucleótidos 75 mer, entre los sitios de *EcoRI* y lo *HindIII* para formar pBST (+) (Figura 3). El nuevo polilinker incluye un sitio de *NotI* único (la secuencia completa en la región del polilinker es dada en la Figura 3).

La expresión del cartucho *NotI* HSA de pAYE309 (EP 431 880) consta de el promotor de PRB1, secuencia de ADN que codifica la secuencia líder híbrida de HSA/MF α -1, la secuencia que codifica ADN de la HSA y el terminador ADH1, fue transferido a pBST (+) para formar pHA1 (Figura 4). La secuencia de codificación de HSA fue retirada desde este plásmido por la digestión con *HindIII* seguida por religación para formar pHA2 (Figura 4).

Clonar el ADNc de hGH, como se describe en Ejemplo 1, proporciona la región de codificación de hGH que carece de la secuencia pro-hGH y los primeros 8 pares de basa (bp) de la secuencia desde la hGH madura. Para construir un plásmido de expresión para la secreción de la hGH de levadura, un promotor de levadura, muestra un péptido señal y los primeros 8 bp de la secuencia de hGH fueron fijadas al extremo 5' de la secuencia de hGH clonada de la siguiente manera:

ES 2 318 418 T3

El fragmento *HindIII* - *SfaNI* desde pHA 1 fue fijado al extremo 5' del fragmento *EcoRI* - *HindIII* de pHGH1 vía dos oligonucleótidos sintéticos, HGH3 y HGH4:

HGH3: 5' - GATAAAGATTCCCAAC - 3'

HGH4: 5' - AATTGTTGGGAATCTTT - 3'

El fragmento *HindIII* formado fue clonado en pHA2 digerido por *HindIII* para hacer pHGH2 (Figura 4), de forma que el ADNc de hGH fue colocado aguas abajo del promotor PRB1 y la secuencia líder de fusión de HSA/MFa - 1 (WO 90/01063). El cartucho de expresión *NotI* contenido en pHGH2, que incluye el terminador ADH1 aguas abajo del ADNc de hGH, fue clonada en pSAC35 digerido por *NotI* (*Sleep et al.*, 1990) para hacer pHGH12 (Figura 4). Este plásmido consta del plásmido entero 2 μ m para proporcionar las funciones de replicación y el gen LEU2 para la selección de transformantes.

El pHGH12 fue introducido en *S. cerevisiae* DB1 (*Sleep et al.*, 1990) por la transformación y transformantes individuales fueron crecidas por 3 días en 30°C en 10 ml de medio YEPD (1% w/v extracto de levadura, 2% w/v peptone, 2% w/v de dextrosa). Después de la centrifugación de las células, los sobrenadantes fueron revisados por (SDS - PAGE) gel de electroforesis de SDS - poliacrilamida y fue encontrado que contiene proteína, el que era del tamaño esperado y que fue reconocida por antiserum anti-hGH (*Sigma*, Poole, R.U.) sobre *Western blots*.

Ejemplo 3

Clonación y expresión de una proteína de fusión de HSA - hGH

Para unir el ADNc de HSA al extremo 5' del ADNc de hGH, el fragmento de *HindIII* - *Bsu361* de pHA1 (contiene la mayor parte del ADNc de HSA) se une al fragmento *EcoRI* - *HindIII* de pHGH1 (contiene la mayor parte del ADNc de hGH) vía los dos oligonucleótidos, HGH7 y HGH8:

HGH7: 5' - TTAGGCTTATTCCCAAC - 3'

HGH8: 5' - AATTGTTGGGAATAAGCC - 3'

El fragmento *HindIII* formado fue clonado en pHA2 digerido con *HindIII* para formar el pHGH10 (Figura 5), y el cartucho de expresión *NotI* de este plásmido fue clonado dentro de *NotI* digerido en pSAC35 para hacer el pHGH16 (Figura 5).

El pHGH16 usado para transformar *S. cerevisiae* DB1 y sobrenadantes de las cultivos fueron analizados como en el Ejemplo 2. Una banda predominante se observa que tiene un peso molecular de aproximadamente 88 kD, correspondiendo a la masa combinada de HA y hGH. El ensayo de *Western blot* usando un antisuero anti-HSA y anti-hGH (*Sigma*) confirma la presencia de los dos partes componentes de la proteína de fusión.

La proteína de fusión fue purificada desde el sobrenadante de cultivo por cromatografía de intercambio catiónico, seguida por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de gel filtración. El análisis de N-terminal de la proteína por secuencia de aminoácido confirma la presencia de la secuencia de albúmina esperada.

El ensayo de actividad de la hormona de crecimiento *in vitro* (*Ealey et al.*, 1995) muestra que la proteína de fusión posee actividad de hGH completa, pero que la potencia fue reducida comparada con el padrón de hGH. En un modelo de aumento de peso de la rata hipofisectomizada, efectuado esencialmente como se describe Farmacopea Europea (1987, monografía 556), la molécula de fusión es más potente que la hGH cuando el mismo número de unidades de actividad se administra diariamente (sobre la base del ensayo *in vitro* anterior). Los experimentos posteriores en los que la proteína de fusión fue administrada una vez cada cuatro días mostraron un rendimiento similar en la respuesta al crecimiento para la administración diaria de hGH. Los experimentos farmacocinéticos en la que la proteína marcada con ¹²⁵I se administra a ratas demuestra un aumento aproximadamente diez veces en el tiempo de vida circulatorio para la proteína de fusión comparado con la hGH (Figura 12).

Un plásmido similar se construye en el que la secuencia líder de ADN que codifica para la invertasa de *S. cerevisiae* (SUC2) se reemplaza la secuencia para el líder híbrido, de forma tal que el líder codificado y el cruce con la secuencia de HSA es como sigue:

MLLQAFLFLLAGFAAKISA ↓ DAHKS.....

Líder Invertasa

HSA

Sobre la introducción en *S. cerevisiae* DB1, este plásmido direcciona la expresión y la secreción de la proteína de fusión en un nivel similar al que se obtiene con pHGH16. El análisis de N-terminal de la proteína de fusión demuestra el anclaje preciso y eficiente de la secuencia líder de la proteína madura.

Ejemplo 4

Clonación y expresión de una proteína de fusión de hGH - HSA

- 5 Para unir el ADNc de hGH al extremo 5' del ADNc de HSA (Figura 6), el ADNc de HSA primero se modifica por mutagénesis dirigida por el sitio cercano *Eco*NI se introduce en la región que codifica al extremo 5'. Esto fue hecho por el método de *Kunkel y col.* (1987) que usa una plantilla de ADN de una sola hebra preparada desde pHA1 y un oligonucleótido sintético, LEU4:

10 LEU4: 5' - GAGATGCACACCTGAGTGAGG - 3'

- La mutagénesis dirigida al sitio usando este oligonucleótido cambia la secuencia de codificación del ADNc de HSA de *Lys4* para *Leu4* (K4L). Sin embargo, este cambio fue reparado cuando el ADNc de hGH fue unido posteriormente al extremo 5' por unión del fragmento *NofI* - *Bam*HI de pHGH2 con el fragmento *Eco*NI - *NofI* del pHA1 mutado, vía los oligonucleótidos *HGH5* de y *HGH6*:

HGH5: 5' - GATCCTGTGGCTTCGATGCACACAAGA - 3'

20 HGH6: 5' - CTCTTGTGTGCATCGAAGCCACAG - 3'

- El fragmento *NotI* formado es clonado en pSAC35 digerido por *NotI* para hacer pHGH14 (Figura 7). El pHGH14 fue usado para transformar *S. cerevisiae* DB1 y el sobrenadante de cultivo fue analizado como en el Ejemplo 2. Una banda predominante se observa que tiene un peso molecular de aproximadamente 88 kD, correspondiendo a la masa combinada de hGH y HA. El ensayo de *Western blot* usa antisuero de anti-HSA y anti-hGH y confirma la presencia de las dos partes componentes de la proteína de fusión.

- La proteína de fusión fue purificada desde el sobrenadante de cultivo por cromatografía de intercambio catiónico, seguida por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de gel filtración. El análisis del N-terminal de la proteína por secuencia de aminoácido confirma la presencia de la secuencia de hGH esperada.

- Los estudios *in vitro* muestran que la proteína de fusión conserva la actividad de hGH, pero es significativamente menos potente que una proteína de fusión que consta de la HA normal completa (1-585) tanto la parte de N-terminal y la hGH como la parte C-terminal, se describe en el Ejemplo 3.

35 Ejemplo 5

Construcción de plásmidos para la expresión de fusiones de hGH para dominios de HSA

- 40 Los polipéptidos de fusión se hacen en el que la molécula de hGH fue unida a los primeros dos dominios de HA (residuos 1 a 387). La fusión al N-terminal de hGH se consigue uniendo el fragmento *HindIII*-*SapI* de pHA1, que contiene la mayor parte de la secuencia de codificación para los dominios 1 y 2 de HA, al fragmento *EcoRI* - *HindIII* de pHGH1, vía los oligonucleótidos HGH11 y HGH12:

45 HGH11: 5' - TGTGGAAGAGCCTCAGAATTTATTCCCAAC - 3'

HGH12: 5' - AATTGTTGGAATAAATTCTGAGGCTCTTCC - 3'

- El fragmento *HindIII* formado fue clonado en pHA2 digerido por *HindIII* para hacer el pHGH37 (Figura 8) y el cartucho de expresión *Nod* de este plásmido fue clonado *NorI* digerido pSAC35. El plásmido da como resultado, el pHGH38 (Figura 8), que contiene un cartucho de expresión que fue descubierto para direccionar la secreción del polipéptido de fusión en el sobrenadante cuando se transformó en *S. cerevisiae* DB1. El ensayo de *western blot* usa antisuero anti-HSA y anti-hGH confirma la presencia de las dos partes de componente de la proteína de fusión.

- La proteína de fusión es purificada desde el sobrenadante de cultivo por cromatografía de intercambio catiónico seguida por cromatografía de gel filtración. Los estudios *in vivo* con proteína purificada muestran que el tiempo de vida en circulación es más largo que la de hGH, y similar a la proteína de fusión que consta de HA normal completa (1-585) como la parte N-terminal y la hGH como la parte C-terminal, como se describe en Ejemplo 3. Los estudios *in vitro* muestran que la proteína de fusión conservaba la actividad de hGH.

- Usando una estrategia similar como se detalla arriba, una proteína de fusión que consta del primer dominio de HA (residuos 1-194) como la parte N-terminal y la hGH como la parte C-terminal, fue clonada y expresada en *S. cerevisiae* DB1. El western blot correspondiente al sobrenadante de cultivo usa antisera anti-HSA y anti-hGH y se confirma la presencia de las dos partes componente de la proteína de fusión.

ES 2 318 418 T3

Ejemplo 6

Expresión de hGH por introducción de un sitio de anclaje entre HSA y hGH

- 5 La introducción de una secuencia de péptido que es reconocida por la proteasa de *Kex2*, entre la proteína de fusión de HA - hGH, admite la secreción de hGH. Una secuencia de codificación Ser Asp Lys Arg de fue presentado usando dos oligonucleótidos, HGH14 y HGH15:

HGH14: 5' - TTAGGCTTAAGCTTGGATAAAAGATTCCCAAC - 3'

10

HGH15: 5' - AATTGTTGGGAATCTTTTATCCAAGCTTAAGCC - 3'

- Éstos fueron usados para unir el fragmento *HindIII* - *Bsu36I* de pHA1 al fragmento *EcoRI* - *HindIII* de pHGH1, los que fueron clonados luego en pHA2 digerido por *HindIII* para hacer el pHGH25 (Figura 9). El cartucho de expresión *NotI* en la que de este plásmido fue clonado en pSAC35*NotI* - digerido para hacer el pHGH31 (Figura 9).

- S. cerevisiae* DB1 transformado con pHGH31 se encuentra para ocultar dos especies muy importantes, como se determina por el análisis de SDS - PAGE de sobrenadantes de cultivo. Las dos especies tienen pesos moleculares de aproximadamente de 66 kD, correspondiendo para HA (la longitud completa), y 22 kDa, corresponden a la (la longitud completa) de la hGH demostrando el anclaje de la proteína de fusión *in vivo* por la proteasa de *Kex2*, o una actividad equivalente. El ensayo de *western blot* usando antisuero anti-HSA y anti-hGH confirma la presencia de las dos especies por separado. El análisis de secuencia N-terminal de la mitad de la hGH confirma el anclaje preciso y eficiente de la mitad de HA.

- 25 La mitad de la hGH se purifica desde el sobrenadante de cultivo por cromatografía de intercambio aniónico seguida por cromatografía de gel filtración. Los estudios *in vitro* con la hGH purificada muestran que la proteína es activa y completamente potente.

- Usando una estrategia similar, proteínas de fusión que constan con el primer dominio de HA (residuos 1-194) o los primeros dos dominios de HA (residuos 1-387), seguida de una secuencia reconocida por la proteasa *Kex2p*, seguida por el ADNc de la hGH, se clonan y expresan *S. cerevisiae* DB1. El ensayo de *western blot* del sobrenadante de cultivo que usa el antisuero anti-HSA y anti-hGH confirma la presencia de las dos especies por separado.

35 Ejemplo 7

Fusión de HSA para la hGH usando una secuencia de unión flexible

- Uniones flexibles, que consta de unidades repetitivas de [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n, donde n es 2 ó 3, se introducen entre el HSA y la proteína de fusión de la hGH por clonación de los oligonucleótidos HGH16, HGH17, HGH 18 y HGH 19:

45 **HGH16: 5' - TTAGGCTTAGGTGGCGGTGGATCCGGCGGTGGTGGATCTTTCCCAAC - 3'**
HGH17: 5' - AATTGTTGGGAAAGATCCACCACCGCCGGATCCACCGCCACCTAAGCC - 3'
50 **HGH18: 5' - TTAGGCTTAGGCGGTGGTGGATCTGGTGGCGGCGGATCTGGTGGCGGTGGATCCTTCCCAAC - 3'**
HGH19: 5' - AATTGTTGGGAAGGATCCACCAGATCCGCGCCACCAATCCACCACCGCCTAAGCC - 3'

- 60 El fusión de HGH16 con HGH17 resulta en n = 2, mientras que el HGH18 fusionado para HGH19 resulta n = 3. Después de la fusión, el oligonucleótidos de doble trenza se clonó con el fragmento aislado *EcoRI* - *Bsu36I* desde pHGH 1 en pHGH10 *Bsu36I* digerido para hacer el pHGH56 (donde n = 2) y pHGH57 (donde n = 3) (Figura 10). EL cartucho de expresión de *NotI* desde estos plásmidos se clonan en *NotI* digerido pSAC35 para hacer pHGH58 y pHGH59, respectivamente.

- 65 Clonar los oligonucleótidos para hacer pHGH56 y pHGH57 presenta un sitio de *BamHI* en las secuencias de enlace, como muestra la Figura 11. Por lo tanto es posible construir las secuencias de enlace en que n = 1 y n = 4, uniendo el fragmento *HindIII* - *BamHI* desde pHGH56 para el fragmento *BamHI* - *HindIII* de pHGH57 (hace n = 1), o el fragmento de *HindI* - *BamHI* de pHGH57 al fragmento *BamHI* - *HindIII* de pHGH56 (hace n = 2). Clonando

éstos fragmentos en el sitio de *HindIII* de pHA2 (descrito en Ejemplo 2), resulta en el pHGH60 (n = 1) y pHGH61 (n = 4) (ver Figura 11). El cartucho de expresión de *NotI* de pHGH60 y pHGH61 son clonados en pSAC35 digerido para hacer pHGH62 y pHGH63, respectivamente.

- 5 La transformación de *S. cerevisiae* con pHGH58, pHGH59, pHGH62 y pHGH63 resulta en transformantes que secretan los polipéptidos de fusión en el sobrenadante.

El ensayo de Western blot usa antisuero anti-HSA y anti-hGH confirma la presencia de las dos partes de componente de las proteínas de fusión.

10

Las proteínas de fusión se purifican desde el sobrenadante de cultivo por cromatografía de intercambio aniónico, seguido por el intercambio aniónico y cromatografía de gel filtración. El análisis de N-terminal de las proteínas por el secuenciación de los aminoácido confirma la presencia de la secuencia de albúmina esperada. El análisis de las proteínas purificadas por espectrometría de masa de destellos confirma un aumento en la masa de 315 Da (n = 1), 630 Da (n = 2), 945 Da (n = 3) y 1260 Da (n = 4) comparado con la proteína de fusión de HSA - hGH descrita en el Ejemplo 3, como era de esperar. La proteína purificada se encuentra activa *in vitro*.

15

Referencias

20

Cunningham, B. C. y col. (1991) *Science* 254, 821-825.

De Vos, A. M. y col. (1992) *Science* 255, 306-312.

Ealey y col. (1995) *Growth Regulation* 5, 36-44.

25

Gleeson y col. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 3459-3465.

Haffner, D. y col., (1994) *J. Clin. Invest.* 93, 1163-1171.

30

Hiramitsu y col. (1990) *App. Env. Microbiol.* 56, 2125-2132.

Hiramitsu y col. (1991) *ibid.* 57, 2052-2056.

Hoffman y **Winston** (1990) *Genetics* 124, 807-816.

35

Kearns, G. L. y col. (1991) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 1148-1156.

Kunkel, T. A. y col. (1987) *Methods in Enzimol.* 154, 367-382.

40

Martial, J. A. y col. (1979) *Science* 205, 602-607.

Maundrell (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10857-10864.

Nomura, N. Y. col. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 532-534.

45

Poznansky, M. J. y col. (1988) *FEBS. Lett.* 239, 18-22.

Saiki y col. (1988) *Science* 239, 487-491.

50

Sambrook, J y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Slepp, D. y col. (1990) *Biol. Technology* 8, 42-46.

55

Strobl, J. S. y **Thomas**, M. J. (1994) *Pharmacol. Rev.* 46, 1-34.

Tokunaga, T. Y. col. (1985) *Gene*, 39, 117-120.

Tsiomenko, A. B. y col. (1994) *Biochemistry (Moscow)* 59, 1247-1256.

60

Zeisel, H. J. y col. (1992) *Horm. Res.* 37 (Suppl. 2), 5-13.

La presente invención y sus diversas realizaciones incluyen los siguientes aspectos:

65

Un polipéptido que consta de una región continua de aminoácidos ligados por uniones peptídicas y comprendiendo una primera región de al menos 10 aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad de secuencia con una región de la misma longitud de hormona de crecimiento (GH) y una segunda región de al menos 10 aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad de secuencia con una región de la misma longitud de albúmina de suero.

El polipéptido debe ser tal que cada una de dichas primera y segunda regiones tenga al menos 95% de identidad de secuencia con dichas longitudes de GH y albúmina, respectivamente. Cada una de dichas primera y segunda región debe tener una longitud de al menos 50 aminoácidos.

5 La primera región puede consistir de aminoácidos ininterrumpidos de la parte C-terminal de GH, o una modificación conservadora de ellos, y el polipéptido liga y activa el receptor GH. La primera región puede tener una longitud de 191 aminoácidos.

La albúmina y/o la hormona de crecimiento puede ser humana.

10 La segunda región puede comprender al menos un dominio ininterrumpido de albúmina o una modificación conservadora de ello. Más específicamente, la segunda región puede comprender aminoácidos ininterrumpidos 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491, 512-585, 1-194, 195-387, 388-585, 1-387 o 195-585 de albúmina humana o una modificación conservadora de ello.

15 La parte N-terminal del polipéptido puede comprender dicha primera región y la parte C-terminal comprende dicha segunda región; o la parte N-terminal del polipéptido puede comprender dicha segunda región y la parte C-terminal comprende dicha primera región.

20 El polipéptido puede consistir de dichas primera y segunda regiones, opcionalmente con aminoácidos adicionales y otros compuestos añadidos a cualquier extremos del polipéptido.

En otro aspecto, la invención provee un medio de cultivo microbiano que comprende células transformadas y el polipéptido. Alternativamente, el medio de cultivo microbiano puede comprender solamente el polipéptido.

25 Un aspecto adicional provee un polinucleótido que codifica el polipéptido; y un huésped microbiano que comprende tal polinucleótido, dispuesto para expresión en el huésped. Preferentemente, el polipéptido se segrega desde el huésped.

30 La invención también provee un proceso para obtener el polipéptido cultivando el huésped y purificando el polipéptido. El polipéptido puede después incluirse en una formulación farmacéutica que comprenda un portador farmacéuticamente aceptable.

35 Los pacientes que tienen una condición que es tratable con hormona de crecimiento pueden tratarse administrando al paciente una cantidad no tóxica del polipéptido a fin de aliviar esa condición.

La invención también provee un método de incrementar más de lo normal la tasa de crecimiento de, o ratio de carne magra a carne grasa en un animal que comprende administrar al animal una cantidad efectiva del polipéptido.

40 Se puede producir hormona de crecimiento mediante la expresión de dicho polinucleótido en un huésped microbiano, preferentemente levadura, teniendo el polipéptido codificado por ello un lugar entre dichas primera y segunda regiones cuyo lugar es separable por un enzima presente en el huésped, o por otro enzima, o químicamente.

45 Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

50 Documentos de patentes citados en la descripción

- | | |
|-------------------|-----------------|
| • EP 330451 A | • EP 361991 A |
| 55 • WO 9315199 A | • WO 9315200 A |
| • EP 413622 A | • EP 399666 A |
| • EP 127305 A | • EP 60057 A |
| 60 • EP 387319 A | • EP 322094 A |
| • EP 251744 A | • EP 258067 A |
| 65 • WO 9001063 A | • US 4857467 A |
| • EP 1991 A | • JP 62096086 A |

- JP 3036516 A
- EP 201239 A
- EP 431880 A
- GB 05077642 A
- 5 • GB 9526733 A

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- SLEEP *et al. Biotechnology*, 1990, vol. 8, 42-46.
- 10 • HIRAMATSU *et al. Appl. Env. Microbiol.*, 1990, vol. 56, 2125-2132.
- BECKER; GUARENTE. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 194, 182.
- 15 • SOUTHERN. *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503.
- BERENT *et al. Biotech.*, 1985, vol. 3, 208.
- SAIKI *et al. Science*, 1988, vol. 239, 487-491.
- 20 • MAUNDRELL. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 10857-10864.
- HOFFMAN; WINSTON. *Genetics*, 1990, vol. 124, 807-816.
- 25 • GLEESON *et al. J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459-3465.
- *European Pharmacopoeia*, 1987.
- CUNNINGHAM, B. C. *et al. Science*, 1991, vol. 254, 821-825.
- 30 • DE VOS, A. M. *et al. Science*, 1992, vol. 255, 306-312.
- EALEY. *Growth Regulation*, 1995, vol. 5, 36-44.
- 35 • HAFFNER, D. *et al. J. Clin. Invest.*, 1994, vol. 93, 1163-1171.
- HIRAMITSU *et al. App. Env. Microbiol.*, 1990, vol. 56, 2125-2132.
- IRAMITSU *et al. APP. ENV. MICROBIOL.*, 1991, vol. 57, 2052-2056.
- 40 • KEARNS, G. L. *et al. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1991, vol. 72, 1148-1156.
- KUNKEL, T. A. *et al. Methods in Enzymol.*, 1987, vol. 154, 367-382.
- 45 • MARTIAL, J. A. *et al. Science*, 1979, vol. 205, 602-607.
- NOMURA, N. *et al. Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, vol. 59, 532-534.
- POZNANSKY, M. J. *et al. FEBS Lett.*, 1988, vol. 239, 18-22.
- 50 • SAMBROOK, J. *et al. Molecular Cloning: a laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.
- SLEEP, D. *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 42-46.
- 55 • STROBL, J. S.; THOMAS, M. *J. Pharmacol. Rev.*, 1994, vol. 46, 1-34.
- TOKUNAGA, T. *et al. Gene*, 1985, vol. 39, 117-120.
- TSIOMENKO, A. B. *et al. Biochemistry (Moscow)*, 1994, vol. 59, 1247-1256.
- 60 • ZEISEL, H. J. *et al. Horm. Res.*, 1992, vol. 37 (2), 5-13.

REIVINDICACIONES

5 1. Un polinucleótido que comprende (i) un elemento promotor de levadura y (ii) una secuencia de terminación de transcripción, asociada operativamente en cada caso con un polinucleótido que codifica una proteína de fusión comprendiendo un primer polipéptido al menos 75% idéntico a la hormona de crecimiento (GH) madura humana fusionado a un segundo polipéptido al menos 75% idéntico a una albúmina de suero de vertebrado comprendiendo al menos dos dominios completos de albúmina de suero, en donde dicha levadura es una *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia* (*Hansenula*) sp., o *Kluyveromyces* sp.

10 2. Un polinucleótido según la Reivindicación 1 en el que dicho elemento promotor de levadura se selecciona de:

- (a) el elemento promotor *S. cerevisiae* PRB1;
- 15 (b) el elemento promotor *S. cerevisiae* PGK1;
- (c) el elemento promotor *S. cerevisiae* GAL1;
- 20 (d) el elemento promotor *S. cerevisiae* GAL10;
- (e) el elemento promotor *S. cerevisiae* CYC1;
- (f) el elemento promotor *S. cerevisiae* PHO5;
- 25 (g) el elemento promotor *S. cerevisiae* TRP1;
- (h) el elemento promotor *S. cerevisiae* ADH1;
- 30 (i) el elemento promotor *S. cerevisiae* gliceraldehyde-3-fosfato dehidrogenasa;
- (j) el elemento promotor *S. cerevisiae* hexoquinasa;
- (k) el elemento promotor *S. cerevisiae* piruvato decarboxilasa;
- 35 (l) el elemento promotor *S. cerevisiae* fosfofructoquinasa;
- (m) el elemento promotor *S. cerevisiae* triose fosfato isomerasa;
- 40 (n) el elemento promotor *S. cerevisiae* phosphoglucose isomerase;
- (o) el elemento promotor *S. cerevisiae* glucoquinasa;
- (p) el elemento promotor *S. cerevisiae* α -feromona factor apareamiento;
- 45 (q) el elemento promotor *S. cerevisiae* α -feromona factor apareamiento;
- (r) el elemento promotor *S. cerevisiae* GUT2;
- 50 (s) el elemento promotor *S. cerevisiae* GPD1;
- (t) el elemento promotor *S. pombe* tiamina-reprimible desde el gen nmt;
- (u) el elemento promotor *S. pombe* glucosa-reprimible fbp1;
- 55 (v) el elemento promotor *Pichia* sp. MOX1;
- (w) el elemento promotor *Pichia* sp. FMD1;
- 60 (x) el elemento promotor *Pichia* sp. AOX1;
- (y) el elemento promotor *Pichia* sp. AOX2; y
- (z) el elemento promotor *Kluyveromyces* PGK1.

65 3. Un polinucleótido según la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 en el que dicha secuencia de terminación de transcripción es la secuencia de terminación *S. cerevisiae* ADH1.

4. Un polinucleótido según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en el que dicho polinucleótido codifica además una secuencia de señal efectiva para dirigir la secreción de la proteína de fusión desde la célula huésped.

5. Un polinucleótido según la Reivindicación 4, en el que la secuencia de señal se selecciona de:

- (a) la secuencia líder de invertasa de *S. cerevisiae*;
- (b) la secuencia líder de fosfatasa ácida de *S. cerevisiae*;
- (c) la secuencia líder MF α -1 de *S. cerevisiae* o la pre-secuencia de ella;
- (d) la pre-secuencia de β -glucanasa de *S. cerevisiae*;
- (e) la pre-secuencia de toxina matadora de *S. cerevisiae*;
- (f) la secuencia líder de glucoamilasa II de *S. diastaticus*;
- (g) la secuencia líder de α -galactosidasa de *S. carlsbergensis*;
- (h) la secuencia líder de toxina matadora de *K. lactis*;
- (i) la secuencia líder de glucoamilasa de *Candida*; y
- (j) una secuencia líder de HSA/MF α -1 híbrida.

6. Un polinucleótido según la Reivindicación 3 en el que la secuencia de señal es una secuencia líder de HSA/MF α -1 híbrida.

7. Un polinucleótido según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4 en el que la albúmina de suero es albúmina de suero humano.

8. Un polinucleótido según la Reivindicación 5 en el que la albúmina de suero humano es albúmina madura de suero humano.

9. Un polinucleótido según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 en el que la hormona de crecimiento es hormona humana de crecimiento.

10. Un polinucleótido según la Reivindicación 7 en el que la hormona humana de crecimiento es hormona humana de crecimiento madura.

11. Un polinucleótido según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8 en el que la parte C-terminal de la albúmina de suero está fusionada a la parte N-terminal de la hormona de crecimiento.

12. Un polinucleótido según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8 en el que la parte N-terminal de la albúmina de suero está fusionada a la parte C-terminal de la hormona de crecimiento.

13. Un polinucleótido según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10 en el que el polinucleótido además codifica una secuencia de unión flexible introducida entre la albúmina de suero y la hormona de crecimiento de dicha proteína de fusión.

14. Un polinucleótido según la Reivindicación 11 en el que la secuencia de unión flexible es [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₂ o [Gly-Gly-Gly-Ser]₃.

15. Un método de producir una proteína de fusión de albúmina de suero y hormona de crecimiento que comprende:

- (a) expresar la proteína de fusión desde una célula huésped de *S. cerevisiae*, en donde la célula huésped comprende un polinucleótido según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12; y
- (b) recuperar la proteína de fusión.

ES 2 318 418 T3

```

F P T I P L S R L F D N A M L R A H R
TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT ATG CTC CGC GCC CAT CGT
^50
L H Q L A F D T Y Q E F E E A Y I P K
CTG CAC CAG CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT GAA GAA GCC TAT ATC CCA AAG
^100
E Q K Y S F L Q N P Q T S L C F S E S
GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG CAG AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT TTC TCA GAG TCT
^150
I P T P S N R E E T Q Q K S N L E L L
ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG AAA TCC AAC CTA GAG CTG CTC
^200
R I S L L L I Q S W L E P V Q S L R S
CGC ATC TCC CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTG GAG CCC GTG CAG TCC CTC AGG AGT
^250
V F A N S L V Y G A S D S N V Y D L L
GTC TTC GCC AAC AGC CTG GTG TAC GGC GCC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA
^300
K D L E E G I Q T L M G R L E D G S P
AAG GAC CTA GAG GAA GGC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC
^350
R T G Q I F K Q T Y S K F D T N S H N
CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC TCA CAC AAC
^400
D D A L L K N Y G L L Y C F R K D M D
GAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAG GAC ATG GAC
^500
K V E T F L R I V Q C R S V E G S C G
AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG TGC CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC
^550
F
TTC TAG

```

Figura 1. secuencia ADNc de la hormona de crecimiento humano, codificando hGH maduro

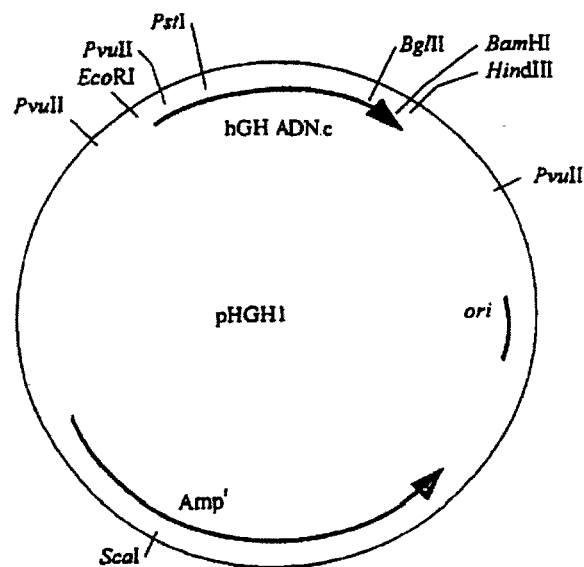


Figura 2

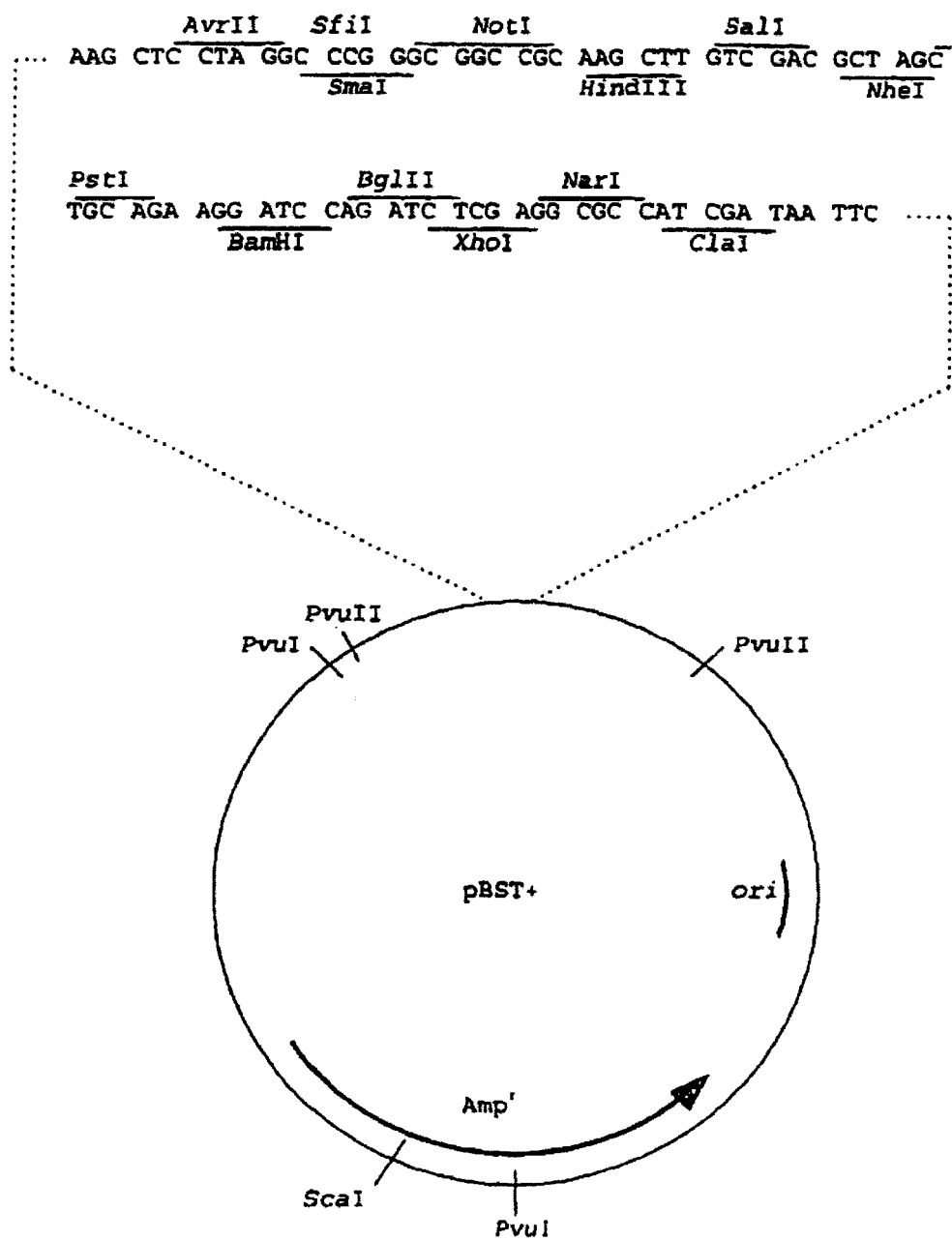


Figura 3

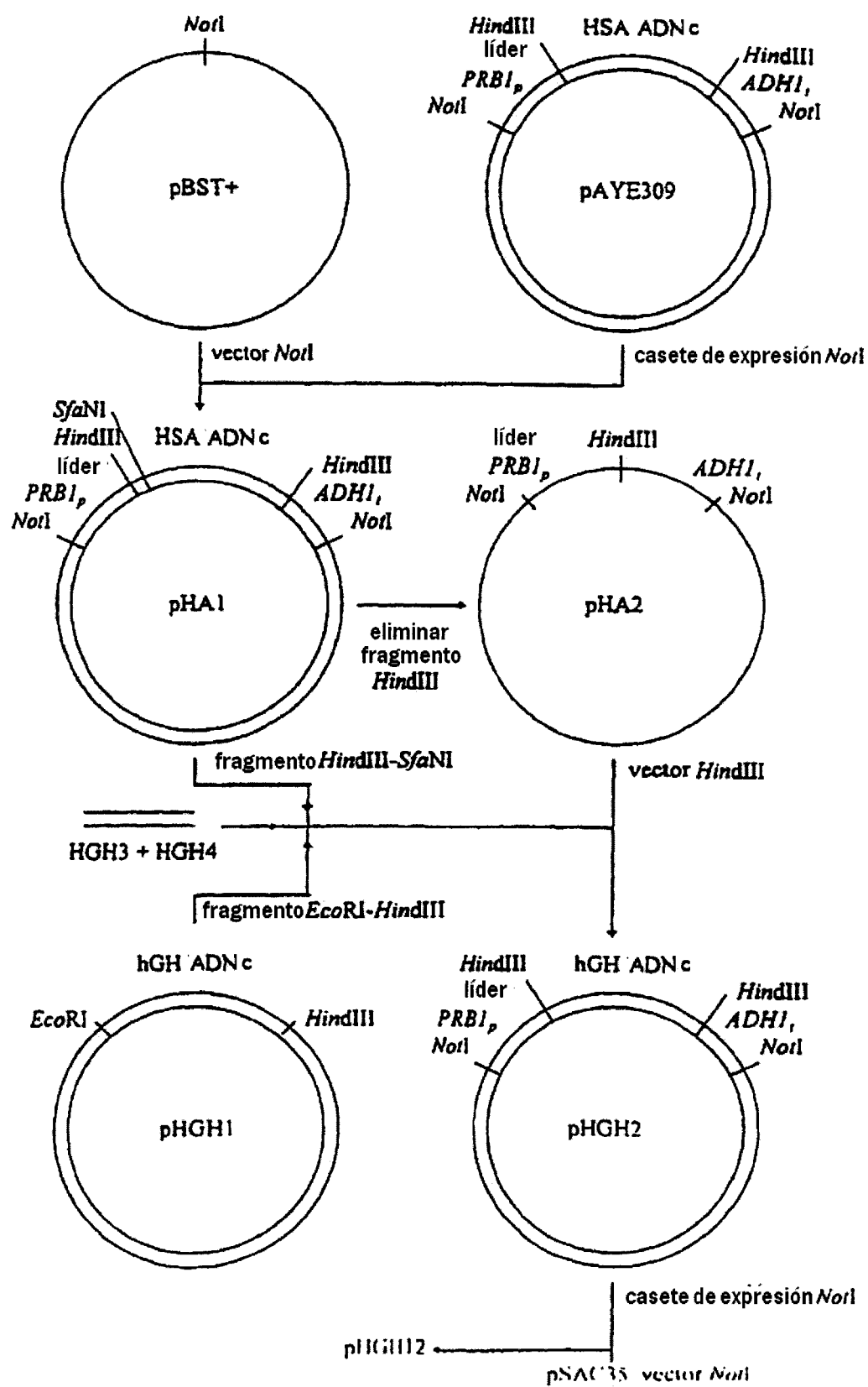


Figura 4

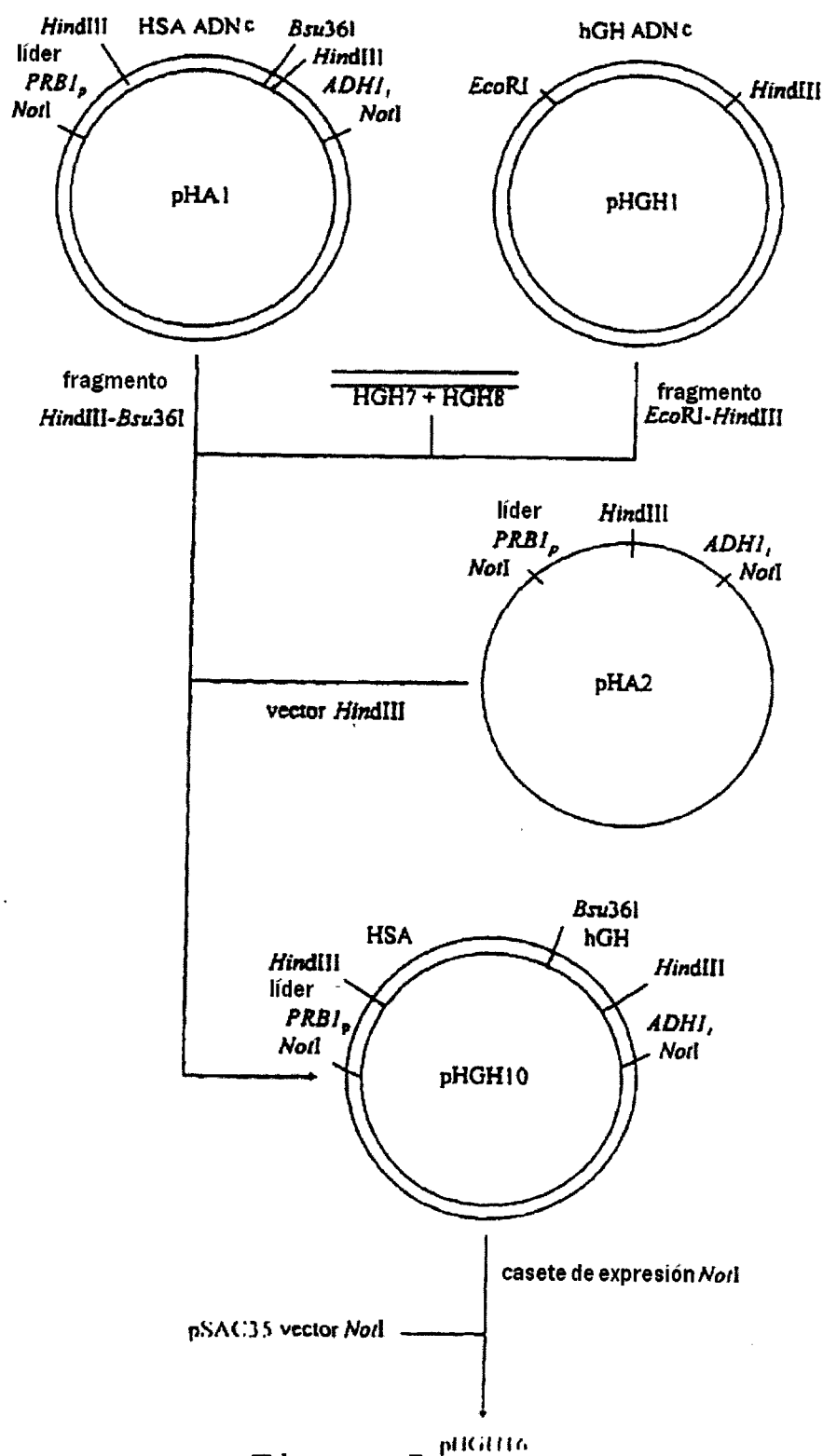


Figura 5

```

D A H K S E V A H R F K D L G E E N F
GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC
K A L V L I A F A Q Y L Q Q C P F E D
AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT
~100
H V K L V N E V T E F A K T C V A D E
CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG
S A E N C D K S L R T L F G D K L C T
TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA
~200
V A T L R E T Y G E M A D C C A K Q E
GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA
P E R N E C F L Q H K D D N P N L P R
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA
~300
L V R P E V D V M C T A F H D N E E T
TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA
F L K K Y L Y E I A R R H P Y F Y A P
TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG
~400
E L L F F A K R Y K A A F T E C C Q A
GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT
~500
A D K A A C L L P K L D E L R D E G K
GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG
A S S A K Q R L K C A S L Q K F G E R
GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA
~600
A F K A W A V A R L S Q R F P K A E F
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT
A E V S K L V T D L T K V H T E C C H
GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT
~700
G D L L E C A D D R A D L A K Y I C E
GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA
N Q D S I S S K L R E C C E K P L L E
AAT CAA GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA
~800
K S H C I A E V E N D E M F A D L P S
AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA
~900

```

Figura 6. Secuencia HSA de ADNc mostrando la región que codifica la proteína madura.

L A A D F V E S K D V C K N Y A E A K
 TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG
 D V F L G M F L Y E Y A R R H P D Y S
 GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT
 ^1000
 V V L L L R L A K T Y E T T L E K C C
 GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT
 A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L
 GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT
 ^1100
 V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G
 GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA
 E Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V
 GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG
 ^1200
 S T P T L V E V S R N L G K V G S K C
 TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA ARC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT
 ^1300
 C K H P E A K R M P C A E D Y L S V V
 TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC
 L N Q L C V L H E K T P V S D R V T K
 CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC ACA GTC ACC AAA
 ^1400
 C C T E S L V N R R P C F S A L E V D
 TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT
 E T Y V P K E F N A E T F T F H A D I
 GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA
 ^1500
 C T L S E K E R Q I K K Q T A L V E L
 TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTC
 V K H K P K A T K E Q L K A V M D D F
 GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC
 ^1600
 A A F V E K C C K A D D K E T C F A E
 GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG
 ^1700
 E G K K L V A A S Q A A L G L
 GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA

Figura 6 (cont'd)

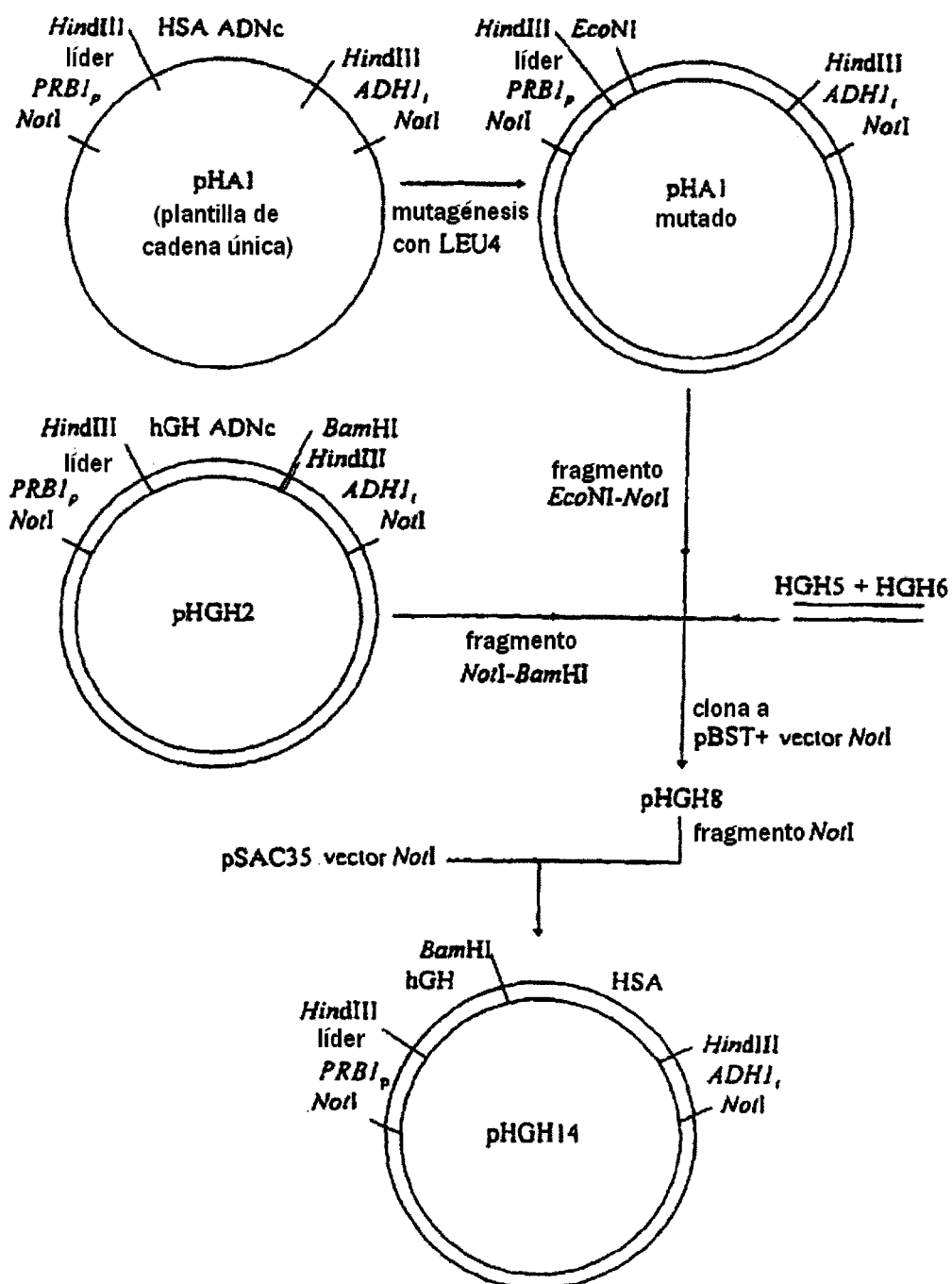


Figura 7

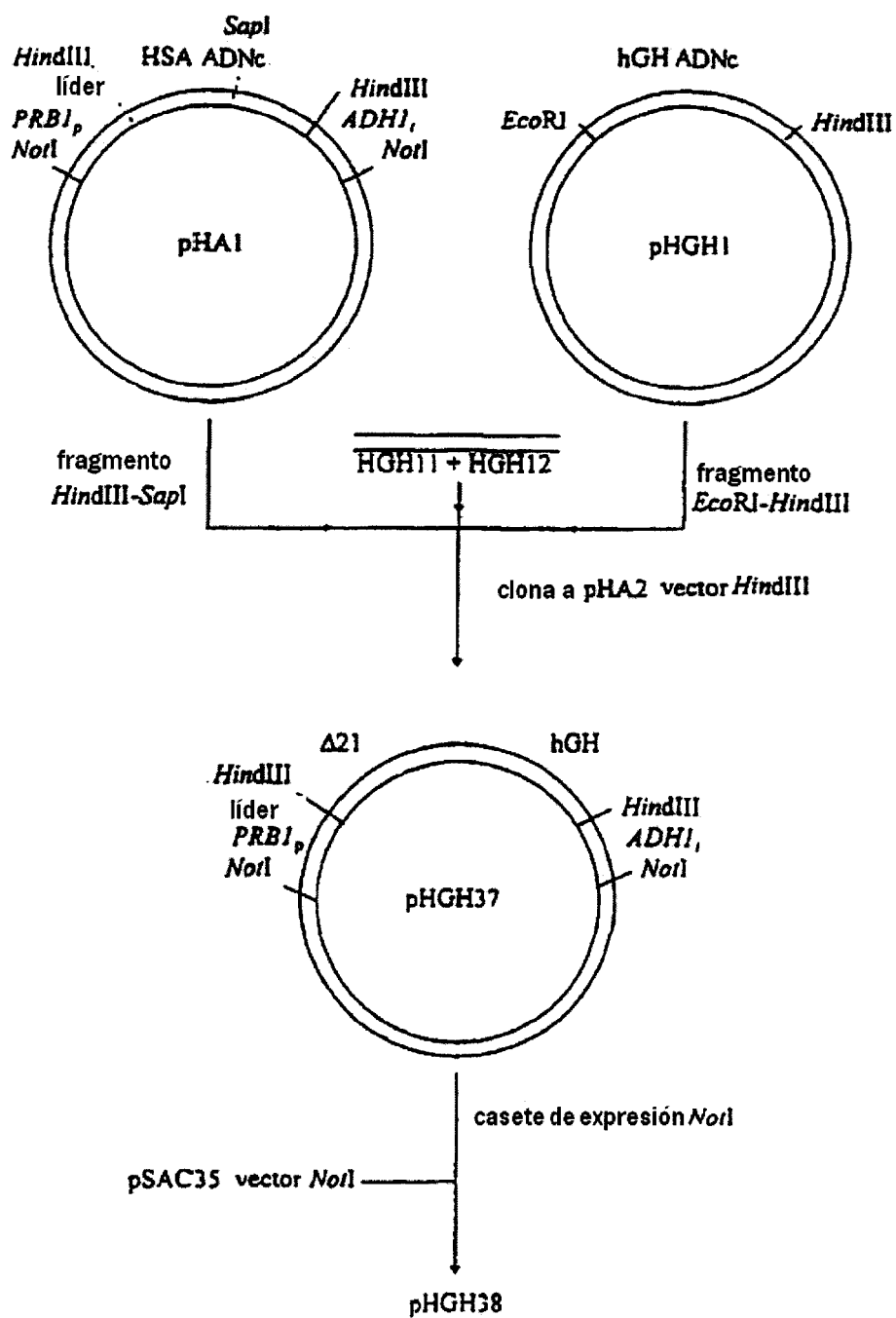


Figura 8

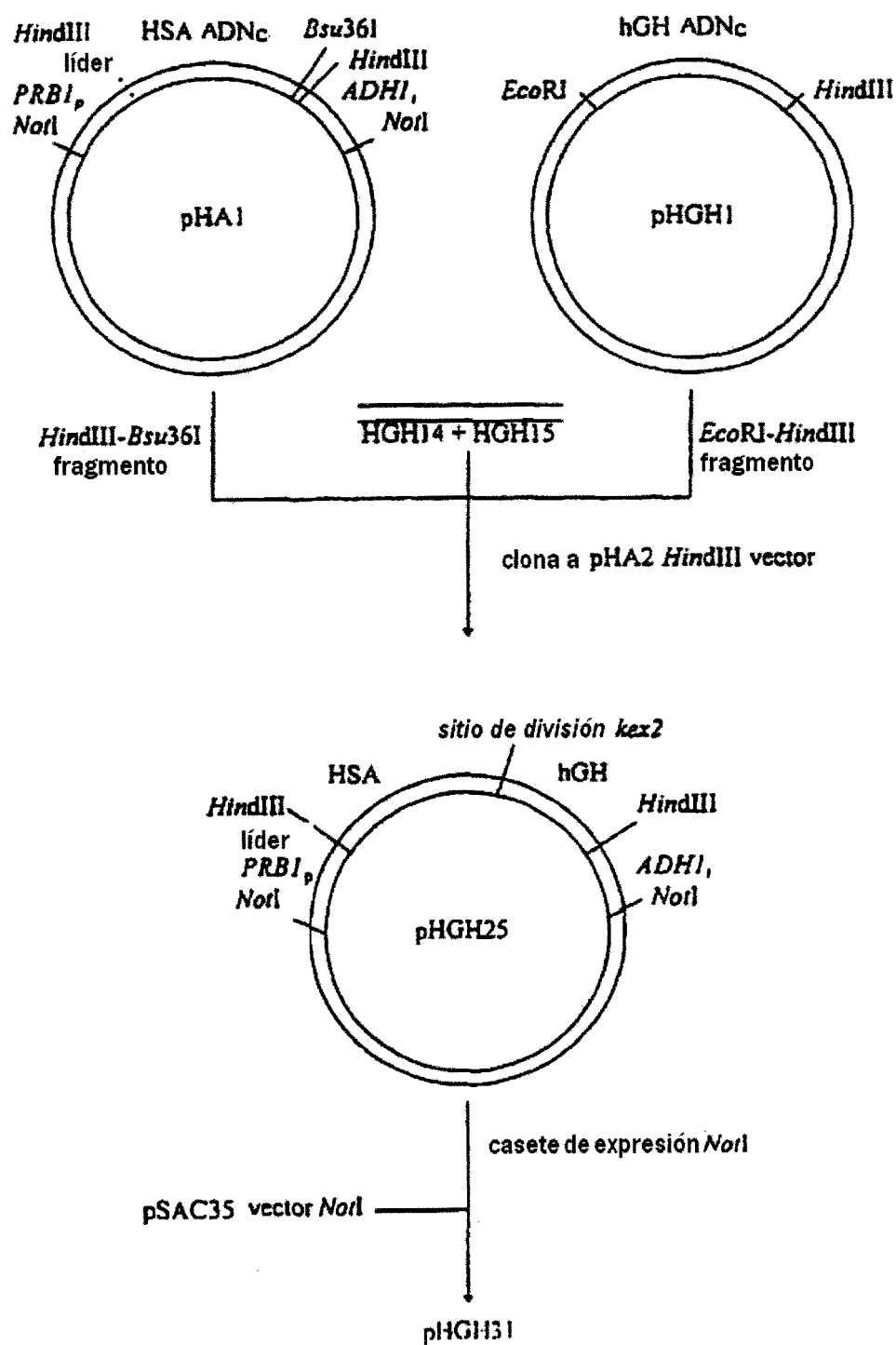


Figura 9

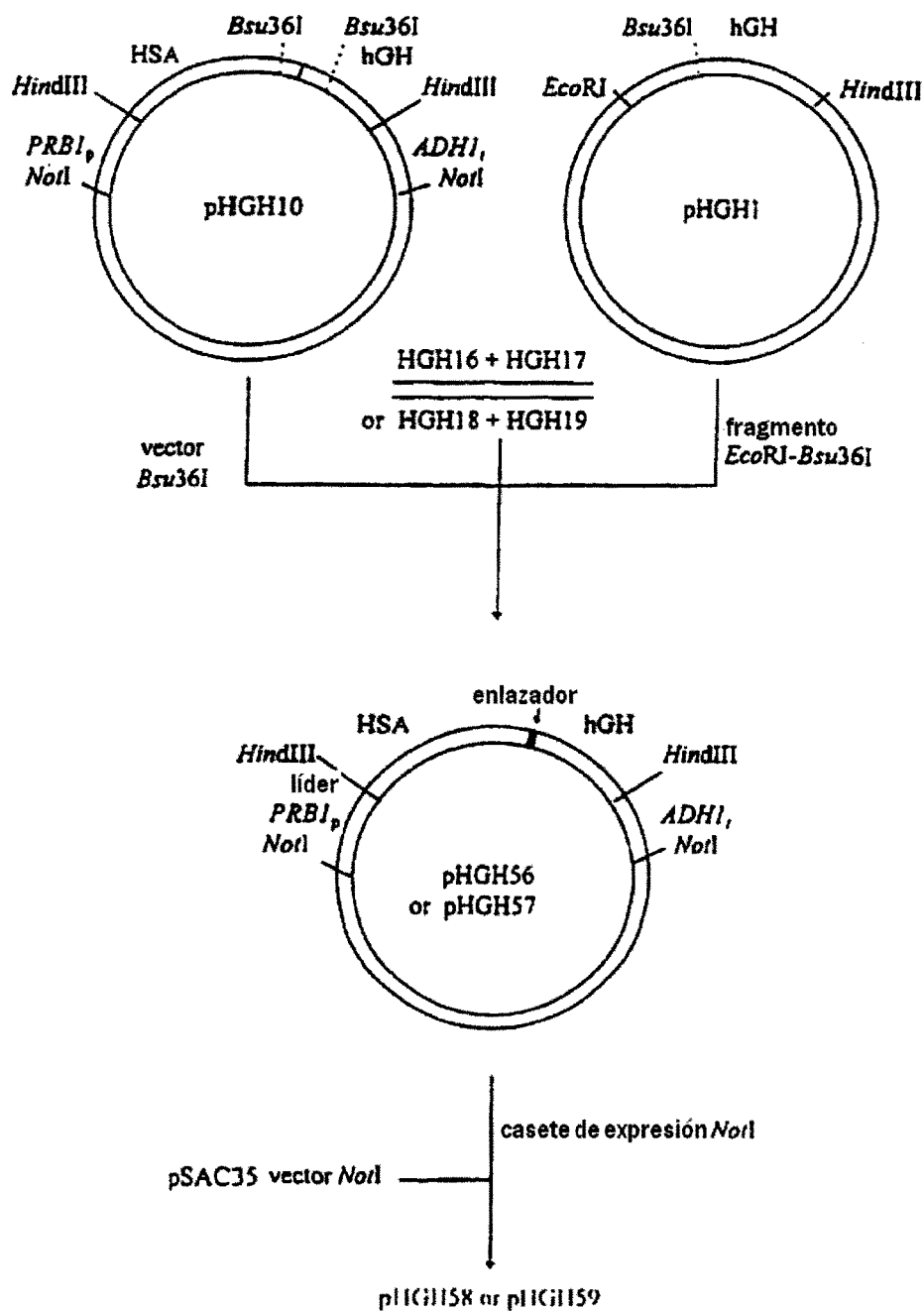


Figura 10

Figura 11

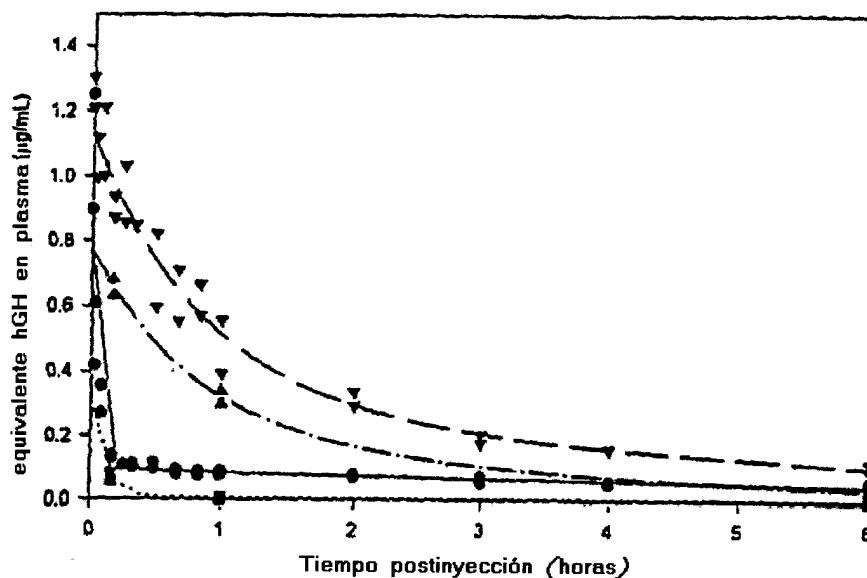
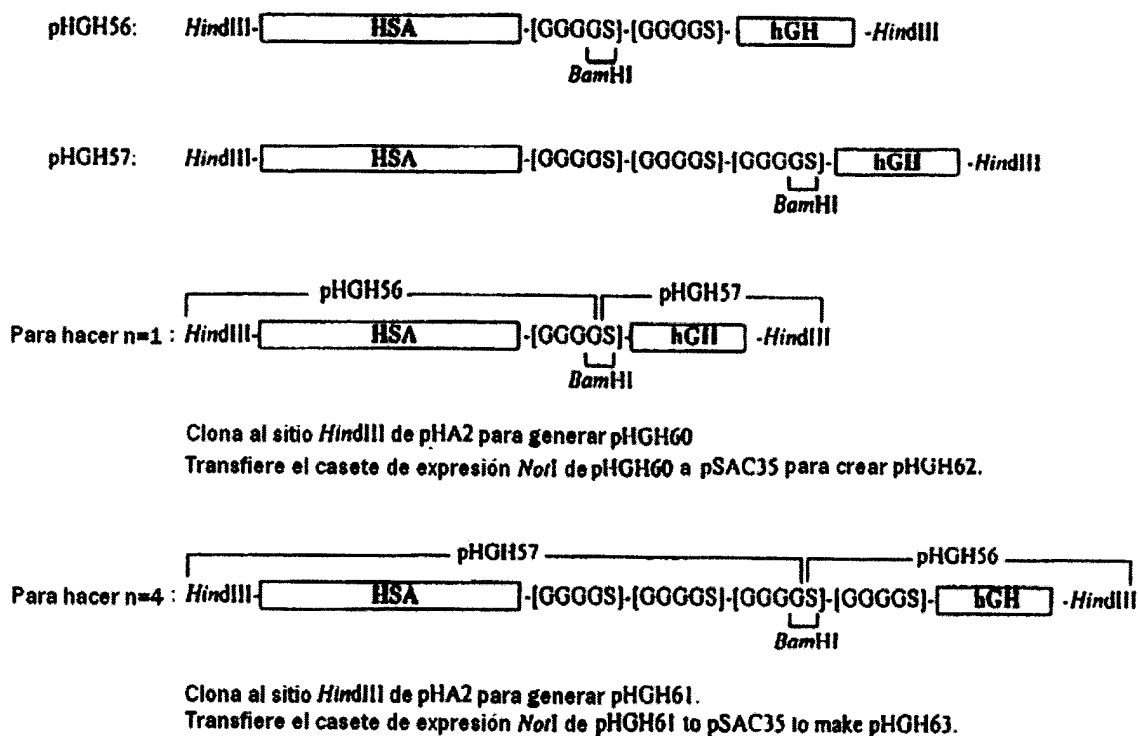


Figura 12

ES 2 318 418 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Delta Biotechnology Limited	
5	<120> Recombinant fusion proteins to growth hormone and serum albumin	
	<130> DELBF/P16809EPdiv1	
	<140> 05077642.6	
	<141> 19 Diciembre 1996	
10	<150> GB 9526733.2	
	<151> 30 Diciembre 1995	
	<160> 26	
	<170> SeqWin99	
15	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR HGH1	
25	<400> 1	
	ccaagaatt cccttatcca ggc	23
30	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador PCR HGH2	
40	<400> 2	
	gggaagctta gaagccacag gatccctcca cag	33
45	<210> 3	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH3	
55	<400> 3	
	gataaagatt cccaac	16
60	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH4	

ES 2 318 418 T3

	<400> 4	
	aattgttggg aatcttt	17
5	<210> 5	
	<211> 17	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH7	
15	<400> 5	
	ttaggcttat tcccaac	17
20	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH8	
30	<400> 6	
	aattgttggg aataagcc	18
35	<210> 7	
	<211> 604	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia de proteínas híbridas basada en la secuencia líder intvertasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y en albúmina de suero humano	
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 318 418 T3

<400> 7

5 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ile Ser Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
20 25 30

10 Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
35 40 45

Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
50 55 60

15 Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
65 70 75 80

Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
85 90 95

20 Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
100 105 110

Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
115 120 125

25 Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
130 135 140

Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
145 150 155 160

30 Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
165 170 175

Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
180 185 190

35 Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
195 200 205

Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
210 215 220

40 Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
225 230 235 240

45

50

55

60

65

ES 2 318 418 T3

Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
 245 250 255
 Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
 260 265 270
 Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp
 275 280 285
 Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu
 290 295 300
 Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys
 325 330 335
 Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu
 340 345 350
 Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu
 355 360 365
 Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp
 370 375 380
 Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val
 385 390 395 400
 Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln
 405 410 415
 Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys
 420 425 430
 Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn
 435 440 445
 Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg
 450 455 460
 Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys
 465 470 475 480
 Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys
 485 490 495
 Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val
 500 505 510
 Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe
 515 520 525
 His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys
 545 550 555 560
 Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys
 565 570 575
 Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys
 580 585 590
 Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 595 600

60 <210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> oligonucleótido LEU4

ES 2 318 418 T3

	<400> 8	
	gagatgcaca cctgagtgag g	21
5	<210> 9	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido HGH5	
15	<400> 9	
	gacacctgtgg ctgcgatgca cacaaga	27
20	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> oligonucleótido HGH6	
30	<400> 10	
	ctcttgtgtg catcgaagcc acag	24
35	<210> 11	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH11	
45	<400> 11	
	tgtggaagag cctcagaatt tattccaac	30
50	<210> 12	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH12	
60	<400> 12	
	aattgttggg aataaattct gaggtcttc c	31
65	<210> 13	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 318 418 T3

<220>
 <223> péptido reconocido por proteasa Kexs2

5 <400> 13
 Ser Leu Asp Lys Arg
 1 5

10 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> enlazador oligonucleótido HGH14

20 <400> 14
 ttaggcttaa gcttgataa aagattccca ac 32

25 <210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> enlazador oligonucleótido HGH15

35 <400> 15
 aattgttggg aatcttttat ccaagcttaa gcc 33

40 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> péptido enlazador flexible sintético

<400> 16

50 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

55 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> péptido enlazador flexible sintético

<400> 17

65 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 318 418 T3

	<210> 18		
	<211> 47		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> enlazador oligonucleótido HGH16		
10	<400> 18		
	ttaggcttag gtggcgggtg atccggcggg ggtggatctt tcccaac		47
15	<210> 19		
	<211> 48		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> enlazador oligonucleótido HGH17		
25	<400> 19		
	aattgttggg aaagatccac caccgccgga tccaccgcca cctaagcc		48
30	<210> 20		
	<211> 62		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
35	<220>		
	<223> enlazador oligonucleótido HGH18		
40	<400> 20		
	ttaggcttag gcggtggtgg atctggtggc ggccgatctg gtggcgggtg atccttccca	60	
	ac	62	
45	<210> 21		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> enlazador oligonucleótido HGH19		
55	<400> 21		
	aattgttggg aaggatccac cgccaccaga tccgccgcca ccagatccac caccgcctaa	60	
	gcc	63	
60	<210> 22		
	<211> 576		
	<212> ADN		
65	<213> ADNc hormona de crecimiento de <i>Homo sapiens</i>		

ES 2 318 418 T3

<400> 22

```

5      ttcccaacca ttcccttatac caggcttttt gacaacgcta tgctccgcgc ccatcgtctg 60
      caccagctgg cctttgacac ctaccaggag tttgaagaag cctatatccc aaaggaacag 120
      aagtattcat tcctgcagaa cccccagacc tccctctgtt tctcagagtc tattccgaca 180
      ccctccaaca gggaggaaac acaacagaaa tccaacctag agctgctccg catctccctg 240
      ctgctcatcc agtcgtggct ggagcccgtg cagtcctca ggagtgtctt cgccaacagc 300
      ctggtgtacg gcgcctctga cagcaacgtc tatgacctcc taaaggacct agaggaaggc 360
      atccaaacgc tgatggggag gctggaagat ggcagccccc ggactgggca gatcttcaag 420
10     cagacctaca gcaagttcga cacaactca cacaacgatg acgcactact caagaactac 480
      gggctgctct actgcttcag gaaggacatg gacaaggctc agacattcct gcgcctcgtg 540
      cagtgcgcgt ctgtggaggg cagctgtggc ttctag 576

```

<210> 23

15 <211> 191

<212> PRT

<213> Hormona de crecimiento de *Homo sapiens*

20

<400> 23

```

25     Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
      1          5          10          15
      Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
      20          25          30
      Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
      35          40          45
30     Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
      50          55          60
      Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
      65          70          75          80
35     Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Ser Leu Arg Ser Val
      85          90          95
      Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
      100          105          110
40     Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
      115          120          125
      Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
      130          135          140
45     Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
      145          150          155          160
      Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
      165          170          175
50     Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
      180          185          190

```

<210> 24

55 <211> 81

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> pBST+ sitio de multi-clonado

<400> 24

```

65     aagctcctag gcccgggcgg ccgcaagctt gtcgacgcta gctgcagaag gatccagatc 60
      tcgaggcgcc atcgataatt c 81

```

ES 2 318 418 T3

<210> 25

<211> 1758

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens* serum albumin cADN

<400> 25

10

15

20

25

30

35

40

```

gatgcacaca agagtgaagg tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa 60
gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta 120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa 180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt 240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa 300
tgcttcttgc aacacaaaaga tgacaaccca aacctccccc gattggtgag accagagggt 360
gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaaa atacttatat 420
gaaattgcca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg 480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctgttgcca 540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt 600
gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc tcgcctgagc 660
cagagatttc ccaaagctga gtttgagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa 720
gtccacacgg aatgctgcca tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt 780
gccaagtata tctgtgaaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa 840
aaacctctgt tggaaaaatc ccaactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct 900
gacttgccct cattaagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct 960
gaggcaaaag atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcatcctgat 1020
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc 1080
tgtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt 1140
gtggaagagc ctcagaattt aatcaaaaca aattgtgagc tttttgagca gcttgagag 1200
tacaaattcc agaattgcgt attagttcgt tacaccaaga aagtacccca agtgtcaact 1260
ccaactcttg tagaggctc aagaaaccta ggaaaagtgg gcagcaaatg ttgtaaacat 1320
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct gaaccagtta 1380
tgtgtgttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaaattgct cacagaatcc 1440
ttggtgaaca ggcgacctg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaa 1500
gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag 1560
agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca 1620
aaagagcaac tgaagctgt tatggatgat ttgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag 1680
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttggtgc tgcaagtcaa 1740
gctgccttag gcttataa 1758

```

45

<210> 26

<211> 379

<212> ADN

50 <213> Albúmina de suero de *Homo sapiens*

<400> 26

55

60

```

dahksvahrk dgnkavaayc dhvkvnvtak tcvadsancd kshtgdkctv atrtygmadc 60
cakrnchxdd nnrvrvdvmc tahdntkky arrhyyaakr ykaatccaad kaackdrdgk 120
assakrkcas kgrakawava rsrkaavskv tdkvhtcch gdcaddrada kycndssskk 180
cckkshcavn dmadsaadvs kdvcknyaak dvgyyarrh dysvvrakty ttkccaaadh 240
cyakvdkvnc ncyknavry tkkvsttvt srngkvskc ckhakrmcad ysvvncvhtk 300
vsdrvtkcct svnrresavd tyvknattha detskrkhta vvkhhkatkk avmdaavkc 360
ckaddktcag kkvaasaag 379

```

65

ES 2 318 418 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Delta Biotechnology Limited	
5	<120> Recombinant fusion proteins to growth hormone and serum albumin	
	<130> DELBF/P16809EPdiv1	
	<140> 05077642.6	
	<141> 19 Diciembre 1996	
10	<150> GB 9526733.2	
	<151> 30 Diciembre 1995	
	<160> 26	
15	<170> SeqWin99	
	<210> 1	
	<211> 23	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR HGH1	
25	<400> 1	
	cccaagaatt cccttatcca ggc	23
30	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR HGH2	
40	<400> 2	
	gggaagctta gaagccacag gatccctcca cag	33
45	<210> 3	
	<211> 16	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH3	
55	<400> 3	
	gataaagatt cccaac	16
60	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH4	

ES 2 318 418 T3

<400> 4

aattgttggg aatcttt

17

5

<210> 5

<211> 17

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> enlazador oligonucleótido HGH7

15

<400> 5

ttaggcttat tccaac

17

20

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> enlazador oligonucleótido HGH8

30

<400> 6

aattgttggg aataagcc

18

35

<210> 7

<211> 604

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Secuencia de proteínas híbridas basada en la secuencia líder invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* y en albúmina de suero humano

45

50

55

60

65

ES 2 318 418 T3

<400> 7

5 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
1 5 10 15
Ile Ser Ala Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
20 25 30
10 Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
35 40 45
Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
50 55 60
15 Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
65 70 75 80
Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
85 90 95
20 Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
100 105 110
Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
115 120 125
25 Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
130 135 140
Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
145 150 155 160
30 Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
165 170 175
Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
180 185 190
35 Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
195 200 205
Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
210 215 220
40 Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
225 230 235 240
Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
245 250 255
45 Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
260 265 270
Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp
275 280 285
50 Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu
290 295 300

55

60

65

ES 2 318 418 T3

Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys
 325 330 335
 Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu
 340 345 350
 Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu
 355 360 365
 Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp
 370 375 380
 Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val
 385 390 395 400
 Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln
 405 410 415
 Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys
 420 425 430
 Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn
 435 440 445
 Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg
 450 455 460
 Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys
 465 470 475 480
 Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys
 485 490 495
 Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val
 500 505 510
 Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe
 515 520 525
 His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys
 530 535 540
 Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys
 545 550 555 560
 Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys
 565 570 575
 Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys
 580 585 590
 Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 595 600

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido LEU4

<400> 8

gagatgcaca cctgagtgag g

<210> 9

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 318 418 T3

	<220>		
	<223> oligonucleótido HGH5		
5	<400> 9		
	gacacctgtgg ctccgatgca cacaaga		27
10	<210> 10		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> oligonucleótido HGH6		
	<400> 10		
20	ctcttgtgtg catcgaagcc acag		24
	<210> 11		
25	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
30	<223> enlazador oligonucleótido HGH11		
	<400> 11		
35	tgtggaagag cctcagaatt tattccaac		30
	<210> 12		
40	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
45	<223> enlazador oligonucleótido HGH12		
	<400> 12		
50	aattgttggg aataaattct gaggtcttc c		31
	<210> 13		
	<211> 5		
55	<212> PRT		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> péptido reconocido por proteasa Kex2		
60	<400> 13		
65	Ser Leu Asp Lys Arg 1 5		
	<210> 14		

ES 2 318 418 T3

	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH14	
	<400> 14	
10	ttaggcttaa gcttgataa aagattccca ac	32
	<210> 15	
15	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> enlazador oligonucleótido HGH15	
	<400> 15	
25	aattgttggg aatcttttat ccaagcttaa gcc	33
	<210> 16	
30	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> péptido enlazador flexible sintético	
	<400> 16	
40	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 1 5 10	
	<210> 17	
45	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> péptido enlazador flexible sintético - 2	
	<400> 17	
55	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 1 5 10 15	
	<210> 18	
60	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
65	<223> enlazador oligonucleótido HGH16	

ES 2 318 418 T3

	<400> 18		
	ttaggcttag gtggcggtgg atccggcggt ggtggatctt tcccaac		47
5	<210> 19		
	<211> 48		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> enlazador oligonucleótido HGH17		
15	<400> 19		
	aattgttggg aaagatccac caccgccgga tccaccgcca cctaagcc		48
20	<210> 20		
	<211> 62		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> enlazador oligonucleótido HGH18		
30	<400> 20		
	ttaggcttag gcggtggtgg atctggtggc ggcggatctg gtggcggtgg atccttccca	60	
	ac	62	
35	<210> 21		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
40	<220>		
	<223> enlazador oligonucleótido HGH19		
45	<400> 21		
	aattgttggg aaggateccac cgccaccaga tccgccgcca ccagatccac caccgcctaa	60	
	gcc	63	
50	<210> 22		
	<211> 576		
	<212> ADN		
	<213> ADNc hormona de crecimiento del <i>Homo sapiens</i>		
55	<400> 22		
	tccccaacca ttcccttata caggcttttt gacaaacgcta tgctccgcgc ccatcgtctg	60	
	caccagctgg cctttgacac ctaccaggag tttgaagaag cctatatccc aaaggaacag	120	
	aagtattcat tcctgcagaa cccccagacc tccctctgtt tctcagagtc tattccgaca	180	
60	ccctccaaca gggaggaaac acaacagaaa tccaacctag agctgctccg catctccctg	240	
	ctgctcatcc agtcgtggct ggagcccgtg cagtcctca ggagtgtctt cgccaacagc	300	
	ctggtgtacg gcgcctctga cagcaacgct tatgacctcc taaaggacct agaggaaggc	360	
	atccaaaacgc tgatggggag gctggaagat ggcagcccc ggactgggca gatcttcaag	420	
	cagacctaca gcaagtccga cacaaactca cacaacgatg acgcactact caagaactac	480	
65	gggctgctct actgttccag gaaggacatg gacaaggctg agacattcct gcgcctcgtg	540	
	cagtgccgct ctgtggaggg cagctgtggc ttctag	576	

ES 2 318 418 T3

<210> 23

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Hormona de crecimiento del *Homo sapiens*

<400> 23

10

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1 5 10 15

15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
35 40 45

20

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65 70 75 80

25

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Ser Leu Arg Ser Val
85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
100 105 110

30

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130 135 140

35

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
165 170 175

40

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
180 185 190

45 <210> 24

<211> 81

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> pBST+ sitio de multi-clonado

55

<400> 24

aagctcctag gcccgggcgg ccgcaagctt gtcgacgcta gctgcagaag gatccagatc 60
tcgaggcgcc atcgataatt c 81

60

<210> 25

<211> 1758

<212> ADN

65 <213> ADNc Albúmina de suero de *Homo sapiens*

ES 2 318 418 T3

<400> 25

5	gatgcacaca	agagtgaggt	tgctcatcgg	tttaaagatt	tgggagaaga	aaatttcaaa	60
	gccttggtgt	tgattgcctt	tgctcagtat	cttcagcagt	gtccatttga	agatcatgta	120
	aaatttagtga	atgaagtaac	tgaatttgca	aaaacatgtg	ttgctgatga	gtcagctgaa	180
	aatttgtaga	aatcacttca	tacccttttt	ggagacaaat	tatgcacagt	tgcaactctt	240
	cgtgaaacct	atggtgaaat	ggctgactgc	tgtgcaaaac	aagaacctga	gagaaatgaa	300
	tgcttcttgc	aacacaaaaga	tgacaaccca	aacctccccc	gatttggtgag	accagaggtt	360
10	gatgtgatgt	gcaactgctt	tcatgacaat	gaagagacat	ttttgaaaaa	atacttatat	420
	gaaattgccca	gaagacatcc	ttacttttat	gccccggaac	tccttttctt	tgctaaaagg	480
	tataaagctg	cttttacaga	atgttgccaa	gctgctgata	aagctgcctg	cctgttgcca	540
	aagctcgatg	aacttcggga	tgaagggaag	gcttcgtctg	ccaaacagag	actcaagtgt	600
	gccagtctcc	aaaaatttgg	agaaaagagct	ttcaaaagcat	gggcagtagc	tcgctcagac	660
15	cagagatttc	ccaaagctga	gtttgcagaa	gtttccaagt	tagtgacaga	tcttaccaaa	720
	gtccacacgg	aatgctgccca	tggagatctg	cttgaatgtg	ctgatgacag	ggcggacctt	780
	gccaaagtata	tctgtgaaaa	tcaagattcg	atctccagta	aactgaagga	atgctgtgaa	840
	aaacctctgt	tggaaaaaatc	ccactgcatt	gccgaagtgg	aaaatgatga	gatgcctgct	900
	gacttgccct	catttagctgc	tgatttttgt	gaaagtaagg	atgtttgcaa	aaactatgct	960
20	gaggcaaagg	atgtcttctt	gggcatgttt	ttgtatgaat	atgcaagaag	gcactcctgat	1020
	tactctgtcg	tgctgtgctg	gagacttgcc	aagacatatg	aaaccactct	agagaagtgc	1080
	tgtgcccgtg	cagatcctca	tgaatgctat	gccaaagtgt	tcgatgaatt	taaacctctt	1140
	gtggaagagc	ctcagaatttt	aatcaaaaca	aattgtgagc	tttttgagca	gcttgagagag	1200
25	tacaaattcc	agaatgcgct	attagttcgt	tacaccaaga	aagtacccca	agtgtcaact	1260
	ccaactcttg	tagaggtctc	aagaaaccta	ggaaaagtgg	gcagcaaatg	ttgtaaacat	1320
	cctgaagcaa	aaagaatgcc	ctgtgcagaa	gactatctat	ccgtggtcct	gaaccagtta	1380
	tgtgtgttgc	atgagaaaaac	gccagtaagt	gacagagtca	ccaaatgctg	cacagaatcc	1440
	ttggtgaaca	ggcgaccatg	cttttcagct	ctggaagtgc	atgaaacata	cgttcccaaa	1500
30	gagtttaatg	ctgaaacatt	caccttccat	gcagatatat	gcacacttct	tgagaaggag	1560
	agacaaatca	agaaacaaac	tgcaacttgt	gagctcgtga	aacacaagcc	caaggcaaca	1620
	aaagagcaac	tgaagctgtg	tatggatgat	ttcgacgctt	ttgtagagaa	gtgctgcaag	1680
	gctgacgata	aggagacctg	ctttgcccag	gagggtaaaa	aacttgttgc	tgcaagtcaa	1740
	gctgccttag	gcttataa					1758

35

<210> 26

<211> 379

40 <212> ADN

<213> Albúmina de suero de *Homo sapiens*

<400> 26

45	dahksvahrk	dgnkavaayc	dhvkvnvtak	tcvadsancd	kshtgdkctv	atrtygmadc	60
	cakrnchkd	nnrvrvdvmc	tahdntkkyy	arrhyyaakr	ykaatccaad	kaackdrdgk	120
	assakrkcas	kgrakawava	rsrkaavskv	tdtkvhtech	gdcaddrada	kycndssskk	180
50	ckkshcavn	dmadsaadvs	kdvcknyaak	dvgyyarrh	dysvvrakty	ttkccaaadh	240
	cyakvdkvkn	ncgyknavry	tkkvstttv	srngkvgskc	ckhakrmcad	ysvvnvvhkt	300
	vsdrvtkcct	svnrscsavg	tyvknattha	dctskrkktta	vvkhkkatkk	avmdaavkc	360
	ckaddktcag	kkvaasaag					379

55

60

65