



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 497**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/505** (2006.01)

**C07K 14/765** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 38/38** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99928656 .0**

86 Fecha de presentación : **15.06.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1088084**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.04.2001**

54

Título: **Proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga.**

30

Prioridad: **15.06.1998 US 89343 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2007**

73

Titular/es: **GTC Biotherapeutics, Inc.**  
**175 Crossing Boulevard**  
**Framingham, Massachusetts 01702, US**

72

Inventor/es: **Young, Michael, W.;**  
**Meade, Harry, M. y**  
**Krane, Ian, M.**

74

Agente: **Torner Lasalle, Nuria**

ES 2 273 497 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).

# ES 2 273 497 T3

## DESCRIPCIÓN

Proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga.

### 5 Antecedentes de la invención

La invención se relaciona con las proteínas de fusión de albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASH), los ácidos nucleicos que codifican a las proteínas de fusión de la EPOa-ASH y los métodos de producción y uso de proteínas de fusión de la EPOa-ASH y ácidos nucleicos.

10 Korhonen *et al*, Eur. J Biochem (1997) 245:482-489 describen la producción de EPO fusionada con  $\beta$ -lactoglobulina en leche. No existe sugerencia alguna que una proteína de fusión de albúmina sérica humana de EPO pueda elaborarse o expresarse para producir EPO en leche.

### 15 Resumen de la invención

En general, la invención incluye una proteína de fusión de EPOa-ASH donde por lo menos un residuo de aminoácido de la mitad EPOa de la proteína de fusión se altera de manera tal que un sitio que actúa como sitio de glicosilación en la eritropoyetina (EPO) no sirve como sitio de glicosilación en la eritropoyetina análoga (EPOa), en que dicho residuo de aminoácido es la EPOa equivalente a un residuo de EPO seleccionado de un grupo compuesto por residuos de aminoácidos Asn<sub>24</sub>, Asn<sub>38</sub>, Asn<sub>83</sub>, y Ser<sub>126</sub>, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASH en la cual se altera por lo menos un residuo de aminoácido que puede actuar como sitio de glicosilación en la eritropoyetina, p. ej., por sustitución o deleción, de manera que no actúa como sitio de glicosilación.

25 En una realización preferida, la proteína de fusión de la EPOa-ASH tiene la fórmula: R1-L-R2; R2-L-R1; o R1-L-R2-L-R1, donde R1 es una secuencia aminoácida de la EPOa, L es un enlace peptídico y R2 es una secuencia aminoácida de la albúmina sérica humana. Preferentemente, R1 y R2 están conectadas de manera covalente por medio de un enlace peptídico.

30 En una realización preferida: se ha borrado un residuo de aminoácido de la EPO que actúa como punto de unión de la glicosilación; se ha reemplazado un residuo de aminoácido de la EPO que actúa como sitio de glicosilación con un residuo de aminoácido que no actúa como sitio de glicosilación; se han alterado el sitio de la glicosilación del residuo del aminoácido Ser126 y por lo menos un sitio de glicosilación adicional con enlace N seleccionado del grupo compuesto de Asn<sub>24</sub>, Asn<sub>38</sub> y Asn<sub>83</sub>; se altera un sitio de glicosilación que proporciona glicosilación con enlace N por medio del reemplazo de un residuo Asn con un residuo de aminoácido diferente, p. ej.; Gln; se altera un sitio de glicosilación que proporciona glicosilación con enlace O por medio del reemplazo de un residuo Ser con un residuo de aminoácido diferente, p. ej.; Ala.

40 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de la EPOa-ASH se produce en la glándula mamaria de un mamífero transgénico no humano, p. ej., un rumiante, p. ej., una cabra.

En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de la EPOa-ASH se secreta en la leche de un mamífero transgénico no humano, p. ej., un rumiante, p. ej., una cabra.

45 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de la EPOa-ASH se produce en un animal transgénico no humano bajo el control de un promotor específico de la glándula mamaria, p. ej., un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de caseína. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina. Preferentemente, el promotor es promotor de  $\beta$  caseína caprina.

50 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASH, se encuentra en un mamífero transgénico no humano, y se secreta en la leche de un mamífero transgénico no humano en concentraciones de por lo menos alrededor de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml o más.

55 En una realización preferida, se ha alterado el residuo del aminoácido Asn<sub>24</sub>, p. ej., por sustitución o deleción. Preferentemente, se ha reemplazado el residuo del aminoácido Asn<sub>24</sub> con Gln.

En una realización preferida, se ha alterado el residuo del aminoácido Asn<sub>38</sub>, p. ej., por sustitución o deleción. Preferentemente, se ha reemplazado el residuo del aminoácido Asn<sub>38</sub> con Gln.

60 En una realización preferida, se ha alterado el residuo del aminoácido Asn<sub>83</sub>, p. ej., por sustitución o deleción. Preferentemente, se ha reemplazado el residuo del aminoácido Asn<sub>83</sub> con Gln.

65 En otra realización, se ha alterado el residuo del aminoácido Ser<sub>126</sub>, p. ej., por sustitución o deleción. Preferentemente, se ha reemplazado el residuo del aminoácido Ser<sub>126</sub> con Ala.

En una realización preferida: se ha alterado cada uno de los residuos de los aminoácidos Asn<sub>24</sub>, Asn<sub>38</sub>, Asn<sub>83</sub> y Ser<sub>126</sub>, p. ej., por sustitución o deleción, de manera tal que no sirven como sitio de glicosilación; se ha reempla-

## ES 2 273 497 T3

zado cada uno de los residuos de los aminoácidos Asn24, Asn38, Asn83 y Ser126 con Gln, Gln, Gln y Ala, respectivamente.

5 En una realización preferida, la proteína de fusión incluye un enlace peptídico y el enlace peptídico cuenta con una o más de las siguientes características: a) permite la rotación de la secuencia del aminoácido análogo de la eritropoyetina y de la secuencia del aminoácido de la albúmina sérica humana, una en relación con la otra; b) es resistente a la digestión por proteasas; y c) no interactúa con la eritropoyetina análoga o con la albúmina sérica humana.

10 En una realización preferida: la proteína de fusión incluye un enlace peptídico y el enlace peptídico tiene de 5 a 60, con preferencia, de 10 a 30, aminoácidos de longitud; el enlace peptídico tiene 20 aminoácidos de longitud; el enlace peptídico tiene 17 aminoácidos de longitud; cada uno de los aminoácidos del enlace peptídico se selecciona de un grupo compuesto de Gly, Ser, Asn, Thr y Ala; el enlace peptídico incluye un elemento Gly-Ser.

15 En una realización preferida, la proteína de fusión incluye un enlace peptídico y el enlace peptídico cuenta con una secuencia con la fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>y</sub>, donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Preferentemente, el enlace peptídico incluye una secuencia con la fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>. Preferentemente, el enlace peptídico incluye una secuencia con la fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro).

20 En una realización preferida, la proteína de fusión incluye un enlace peptídico y el enlace peptídico cuenta con una secuencia con la fórmula (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)<sub>y</sub>, donde y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Preferentemente, el enlace peptídico incluye una secuencia con la fórmula (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro).

25 En otro aspecto, la invención incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh donde la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126 (p. ej., únicamente los aminoácidos 24, 38, 83 y 126 difieren del tipo salvaje).

30 En otro aspecto, la invención incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh que incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

35 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

40 En otro aspecto, la invención incluye, una proteína de fusión de EPOa-ASh que incluye de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

45 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

50 En otro aspecto, la invención incluye, un ácido nucleico aislado con una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh donde se altera por lo menos un residuo de aminoácido de manera tal que un sitio que actúa como sitio de glicosilación en la EPO no actúa como el sitio de glicosilación en la EPOa, p. ej., se altera una proteína de fusión de EPOa-ASh en donde por lo menos un residuo de aminoácido de la EPOa-ASh codificada puede actuar como sitio de glicosilación en la eritropoyetina, p. ej., por sustitución o delección, de manera tal que no actúa como sitio de glicosilación.

55 En otro aspecto, la invención incluye, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh donde la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

60 En otro aspecto, la invención incluye, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh que incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

65 En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

## ES 2 273 497 T3

En otro aspecto, la invención incluye, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh que incluye de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

5 En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

10 En otro aspecto, la invención incluye, un vector de expresión o un constructo que incluye un ácido nucleico de la invención.

En una realización preferida, el vector o constructo incluye además: un promotor; un marcador seleccionable; un origen de la duplicación; o un ADN homólogo a una especie que no sea humana, p. ej., ADN caprino.

15 En realizaciones preferidas, el promotor es un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de la caseína. El promotor específico de la leche es un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina. Preferentemente, el promotor es un promotor de β caseína caprina.

20 En otro aspecto, la invención incluye una célula con un vector o un ácido nucleico de la invención.

En otro aspecto, la invención incluye un método para producir una fusión de EPOa-ASh en un constructo o vector de ácido nucleico. El método incluye la formación en el constructo o vector de una secuencia en la cual un ácido nucleico que codifica una eritropoyetina análoga está vinculado en estructura a un ácido nucleico que codifica la albúmina sérica humana.

25 En otro aspecto, la invención incluye un método para producir una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., de una célula cultivada. El método incluye el suministro de una célula que incluye un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh y expresa la proteína de fusión de EPOa-ASh a partir del ácido nucleico, produciendo así la proteína de fusión de EPOa-ASh.

30 En una realización preferida, la célula es una célula de mamífero, levadura, planta, insecto o bacteria. Células de mamíferos adecuadas incluyen células CHO u otros sistemas de expresiones similares.

35 En una realización preferida, la célula es una célula microbiana, una célula cultivada o una célula de una línea celular.

40 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh se libera en el medio de cultivo.

En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh se libera en el medio de cultivo y el método incluye además la purificación de la proteína de fusión de EPOa-ASh del medio de cultivo.

45 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

50 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

55 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

60 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

65 La invención también incluye una célula cultivada con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento. La invención también incluye los métodos para producir dichas células, p. ej., introduciendo en la célula o formando en la célula un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento.

En otro aspecto, la invención incluye, un método para producir una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una EPOa-ASh descrita en este documento. El método incluye la provisión de un organismo transgénico no humano que

## ES 2 273 497 T3

incluye un transgén que dirige la expresión de la proteína de fusión de EPOa-ASh; permitiendo que el transgén se exprese; y, preferentemente, recuperando una proteína de fusión de EPOa-ASh producida transgénicamente, p. ej., del organismo no humano o de un producto producido por el organismo no humano.

5 En una realización preferida, el organismo transgénico no humano es un animal transgénico no humano, p. ej., un mamífero transgénico no humano, p. ej., un animal lechero transgénico no humano, p. ej., una cabra transgénica o una vaca transgénica.

10 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh se secreta en un fluido corporal y el método incluye además la purificación de la proteína de fusión de EPOa-ASh del fluido corporal.

15 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh producida transgénicamente se crea en la glándula mamaria de un mamífero transgénico no humano, preferentemente bajo el control de un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de caseína. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina. Preferentemente, el promotor es un promotor de  $\beta$  caseína caprina.

20 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se produce en la glándula mamaria de un mamífero transgénico no humano, p. ej., un rumiante, p. ej., un animal lechero, p. ej., una cabra o una vaca.

En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se secreta en la leche de un mamífero transgénico no humano en concentraciones de por lo menos alrededor de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml o más.

25 En realizaciones preferidas el método incluye además la recuperación de la proteína de fusión de EPOa-ASh del organismo no humano o de un producto producido por el organismo no humano, p. ej., leche, semillas, cabello, sangre, huevos u orina.

En otra realización, la proteína de fusión de EPOa-ASh se produce en una planta transgénica.

30 En una realización preferida, la eritropoyetina análoga incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

35 En una realización preferida, una proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

40 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

45 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

50 En otro aspecto, la invención incluye un método para producir una proteína de fusión de EPOa-ASh transgénica, p. ej., una fusión de EPOa-ASh descrita en este documento. El método incluye la provisión de un mamífero transgénico no humano, p. ej., una cabra o vaca, que incluye un transgén que permite la expresión de la proteína de fusión de EPOa-ASh; permitiendo que el transgén se exprese; y, preferentemente, recuperando la proteína de fusión de EPOa-ASh de la leche de un animal transgénico no humano.

55 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se produce en una glándula mamaria del mamífero transgénico no humano, p. ej., un rumiante, p. ej., una cabra o una vaca.

60 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se secreta en la leche del mamífero transgénico no humano, p. ej., un rumiante, p. ej., un animal lechero, p. ej., una cabra o una vaca.

65 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se produce bajo el control de un promotor específico de la glándula mamaria, p. ej., un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de caseína. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina. Preferentemente, el promotor es un promotor de  $\beta$  caseína caprina.

## ES 2 273 497 T3

En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se secreta en la leche de un mamífero transgénico no humano en concentraciones de por lo menos alrededor de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml o más.

5 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

10 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

15 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

20 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

25 En otro aspecto, la invención incluye, un método para proveer una preparación transgénica que incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento, en la leche de un mamífero transgénico no humano. El método incluye: la provisión de un mamífero transgénico no humano con una secuencia de codificación de una proteína de fusión de EPOa-ASh conectada durante la operación a una secuencia promotora cuyo resultado es la expresión de la secuencia de codificación de la proteína en las células epiteliales de una glándula mamaria, permitiendo la expresión de la proteína de fusión, y obteniéndose la leche del mamífero, proporcionando de esta manera la preparación transgénica no humana.

30 En una realización preferida, la secuencia de codificación de la proteína de fusión de EPOa-ASh conectada durante la operación a una secuencia promotora se introduce en la línea germinal del mamífero transgénico no humano.

35 En una realización preferida, la eritropoyetina análoga incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

40 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

45 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

50 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

55 En otro aspecto, la invención incluye, un método para proveer una preparación transgénica que incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento, en la leche caprina o bovina transgénica. El método incluye la provisión de una cabra o vaca transgénica con una secuencia de codificación de una proteína de fusión de EPOa-ASh conectada durante la operación a una secuencia promotora cuyo resultado es la expresión de la secuencia de codificación de la proteína en las células epiteliales de la glándula mamaria, permitiendo que la proteína de la fusión se exprese, y obteniéndose leche caprina o bovina, proporcionando de esta manera la preparación transgénica.

60 En una realización preferida, la eritropoyetina análoga incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

65 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

## ES 2 273 497 T3

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

5 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

10 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

En otro aspecto, la invención incluye, un organismo transgénico no humano, que incluye un transgén que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento.

15 En una realización preferida, el organismo transgénico no humano es una planta o animal transgénico no humano. Animales transgénicos no humanos preferidos incluyen: mamíferos; aves; reptiles; marsupiales; y anfibios no humanos. Mamíferos no humanos adecuados incluyen: rumiantes; ungulados; mamíferos domesticados; y animales lecheros no humanos. Animales no humanos particularmente preferidos incluyen: ratones, cabras, ovejas, camellos, conejos, vacas, cerdos, caballos, bueyes y llamas. Aves adecuadas incluyen gallinas, gansos y pavos. Donde la proteína transgénica se secreta en la leche de un animal transgénico no humano, el animal debe tener la capacidad para producir por 20 lo menos 1, y con preferencia por lo menos 10, o 100, litros de leche no humana por año.

En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se encuentra bajo el control de un promotor específico de la glándula mamaria, p. ej., un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de caseína. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, 25 promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina. Preferentemente, el promotor es un promotor de  $\beta$  caseína caprina.

En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se secreta en la leche en concentraciones de por lo menos alrededor de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml o más.

30 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

35 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

40 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

45 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

50 En otro aspecto, la invención incluye, una vaca, cabra u oveja transgénica, que incluye un transgén que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento. En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se encuentra bajo el control de un promotor específico de la glándula mamaria, p. ej., un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de caseína. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina. Preferentemente, el promotor es un promotor de 55  $\beta$  caseína caprina.

En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se secreta en la leche en concentraciones de por lo menos alrededor de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml o más.

60 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

65 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

## ES 2 273 497 T3

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

5 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASH incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

10 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

En otro aspecto, la invención incluye una manada de animales transgénicos no humanos con por lo menos un animal transgénico no humano hembra y uno macho, donde cada animal no humano incluye un transgén de proteína de fusión de EPOa-ASH, p. ej., un transgén que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASH descrita en este documento.

15 En una realización preferida, un animal transgénico no humano de la manada es un mamífero, ave, reptil, marsupial o anfibio no humano. Mamíferos no humanos adecuados incluyen: rumiantes; ungulados; mamíferos domesticados; y animales lecheros. Animales no humanos particularmente preferidos incluyen: ratones, cabras, ovejas, camellos, conejos, vacas, cerdos, caballos, bueyes y llamas. Aves adecuadas incluyen gallinas, gansos y pavos. Donde la proteína transgénica se secreta en la leche de un animal transgénico no humano, el animal debe tener la capacidad para producir por lo menos 1, y con preferencia por lo menos 10, o 100, litros de leche no humana por año.

20 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASH se encuentra bajo el control de un promotor específico de la glándula mamaria, p. ej., un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de caseína. El promotor específico de la leche es un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina.

En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASH se secreta en la leche en concentraciones de por lo menos alrededor de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml o más.

30 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

35 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASH incluye de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

40 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASH incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

45 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

50 En otro aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica con una cantidad terapéutica efectiva de una proteína de fusión de EPOa-ASH, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASH descrita en este documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la composición incluye leche.

55 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

60 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASH incluye de izquierda a derecha una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

65 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASH incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

## ES 2 273 497 T3

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

5 Proporcionamos un “*kit*” que incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento, empaquetado con instrucciones para el tratamiento de un sujeto que necesita eritropoyetina.

10 En una realización preferida, el sujeto es un paciente que sufre de anemia asociada con insuficiencia renal, enfermedad crónica, infección por el VIH, pérdida de sangre o cáncer.

En otra realización preferida, el sujeto es un paciente preoperatorio.

15 En una realización preferida, la eritropoyetina análoga incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

20 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

25 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

30 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

Proporcionamos una preparación purificada de una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento.

35 En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10, 100 ó 1000 microgramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh. En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10, 100 ó 1000 miligramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh.

40 En otro aspecto, la invención incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh o una preparación purificada de la misma, donde la eritropoyetina análoga incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

45 En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10, 100 ó 1000 microgramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh. En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10, 100 ó 1000 miligramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh.

50 En otro aspecto, la invención incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh o una preparación purificada de la misma; que incluye, de izquierda a derecha, una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

55 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

60 En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10, 100 ó 1000 microgramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh. En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10, 100 ó 1000 miligramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh.

65 En otro aspecto, la invención incluye una proteína de fusión de EPOa-ASh o una preparación purificada de la misma, que incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

## ES 2 273 497 T3

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

5 En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10 ó 100 miligramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh.

En realizaciones preferidas, la preparación incluye por lo menos 1, 10 ó 100 gramos de la proteína de fusión de EPOa-ASh.

10 En otro aspecto, la invención incluye el uso de una cantidad terapéutica efectiva de una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que sufre una insuficiencia renal, enfermedad crónica, infección por el VIH, pérdida de sangre o cáncer.

15 En otra realización preferida, el sujeto es un paciente preoperatorio.

En realizaciones preferidas, la EPOa-ASh se administra repetidamente, p. ej., por lo menos dos, tres, cinco o 10 veces.

20 En una realización preferida, la eritropoyetina análoga incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

25 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

30 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

35 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

40 Proporcionamos un método para tratar a un sujeto que necesita eritropoyetina (hecho que no forma parte de la invención). El método incluye administrar o proporcionar al sujeto un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh, p. ej., una proteína de fusión descrita en este documento.

En una realización preferida, el ácido nucleico se transfiere a una célula blanco del sujeto.

45 En una realización preferida, el ácido nucleico se transfiere o proporciona a un portador biológicamente efectivo p. ej., un vector de expresión.

En una realización preferida, el ácido nucleico se transfiere o proporciona en una célula, p. ej., una célula autóloga, alogeneica o xenogeneica.

50 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

55 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

60 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

65 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

## ES 2 273 497 T3

Proporcionamos un método para producir un organismo transgénico no humano que contiene un transgén de EPOa-ASh. El método incluye proporcionar a una célula o formar en ella un organismo no humano, un transgén de EPOa-ASh, p. ej., un transgén que codifique una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento; y permitir que la célula, o un descendiente de la célula, dé lugar a un organismo transgénico no humano.

5 En una realización preferida, el organismo transgénico no humano es una planta o animal transgénico. Animales transgénicos preferidos incluyen: mamíferos; aves; reptiles; marsupiales; y anfibios. Mamíferos no humanos adecuados incluyen: rumiantes; ungulados; mamíferos domesticados; y animales lecheros. Animales no humanos particularmente preferidos incluyen: ratones, cabras, ovejas, camellos, conejos, vacas, cerdos, caballos, bueyes y llamas. Aves adecuadas incluyen gallinas, gansos y pavos. Donde la proteína transgénica se secreta en la leche de un animal transgénico no humano, el animal no humano debe tener la capacidad para producir por lo menos 1, y con preferencia por lo menos 10, o 100, litros de leche por año.

15 En realizaciones preferidas, la proteína de fusión de EPOa-ASh se encuentra bajo el control de un promotor específico de la glándula mamaria, p. ej., un promotor específico de la leche, p. ej., una proteína sérica láctea o un promotor de caseína. El promotor específico de la leche puede ser un promotor de caseína, promotor de beta lactoglobulina, promotor de proteína del ácido sérico o promotor de lactoalbúmina. Preferentemente, el promotor es un promotor de  $\beta$  caseína caprina.

20 En realizaciones preferidas, el organismo no humano es un mamífero no humano, y la proteína de fusión de EPOa-ASh se secreta en la leche del animal transgénico no humano en concentraciones de por lo menos alrededor de 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml o más.

25 En una realización preferida, la EPOa incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

30 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye de izquierda a derecha una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

35 En una realización preferida, la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, p. ej., un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y una EPOa que incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

40 En una realización preferida, la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

45 Proporcionamos una proteína de eritropoyetina análoga (EPOa), o una preparación purificada de la misma, p. ej., la mitad EPOa de una proteína de fusión de EPOa-ASh descrita en este documento, donde se altera por lo menos un residuo de aminoácido de manera tal que un sitio que actúa como sitio de glicosilación en la EPO no actúa como el sitio de glicosilación en la EPOa, p. ej., una EPOa en donde por lo menos un residuo de aminoácido que puede actuar como sitio de glicosilación en la eritropoyetina se altera, p. ej., por sustitución o delección, de manera tal que no actúa como sitio de glicosilación.

50 En una realización preferida, la eritropoyetina análoga incluye residuos de aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

En una realización preferida, la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

55 En otro aspecto, la invención incluye, un ácido nucleico aislado con una secuencia nucleótida que codifica una EPOa descrita en este documento.

En otro aspecto, la invención incluye un vector de expresión o un constructo que incluye un ácido nucleico de la EPOa descrito en este documento.

60 En una realización preferida, el vector o constructo incluye además: un promotor; un marcador seleccionable; un origen de la duplicación; o un ADN homólogo a una especie que no sea humana, p. ej., ADN caprino.

En otro aspecto, la invención incluye una célula que incluye un vector o constructo que incluye un ácido nucleico de la EPOa descrito en este documento.

65 Una preparación purificada, preparación sustancialmente pura de un polipéptido, o un polipéptido aislado tal como se usa en este documento, significa un polipéptido que se ha separado por lo menos de otra proteína, lípido o ácido nucleico con el cual se suscita en la célula u organismo no humano que lo expresa, p. ej., de una proteína, lípido o ácido

## ES 2 273 497 T3

nucleico en un animal transgénico no humano o en un fluido, p. ej., leche u otra sustancia, p. ej., un huevo producido por un animal transgénico no humano. Preferentemente, el polipéptido se separa de las sustancias, p. ej., anticuerpos o matriz de gel, p. ej., poliacrilamida, que se utilizan para purificarlo. Preferentemente, el polipéptido constituye por lo menos el 10, 20, 50, 70, 80 ó 95% del peso seco de la preparación purificada. Preferentemente, la preparación contiene:  
5 suficiente polipéptido que permite el secuenciamiento de la proteína: por lo menos 1, 10 ó 100  $\mu\text{g}$  del polipéptido; por lo menos 1, 10 ó 100  $\mu\text{g}$  del polipéptido.

Tal como se usa en este documento, “albúmina sérica humana” o “ASh” se refiere al polipéptido que contiene la secuencia aminoácida descrita por Minghetti *et al. Biol. Chem.* 261:6747-6757, 1986; Lawn *et al. Nucl. Acids Res.* 9:6103, 1981. En realizaciones preferidas, se incluyen variaciones de la secuencia donde ha habido sustitución, inserción o delección de uno o hasta dos, cinco, 10 ó 20 residuos de aminoácidos.  
10

Las variantes tendrán sustancialmente la misma inmunogenicidad, p. ej., ratones, ratas, conejos, primates, babuinos o humanos, así como la ASh. Las variantes, cuando se incorporan a una proteína de fusión que incluye EPOa, tendrán como resultado una EPOa-ASh, una fusión que tiene un tiempo de depuración similar, p. ej., en lauchas, conejos o humanos, y actividad así como una proteína de fusión que incluye la EPOa y ASh. Tal como se usa en este documento, “eritropoyetina” o “EPO” se refiere a una hormona glicoproteica involucrada en la maduración de células progenitoras de eritroides a eritrocitos. La secuencia de la EPO se encuentra en Powell, J.S., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 83:6465-6469 (1986).  
15  
20

Un ácido nucleico sustancialmente puro es un ácido nucleico que es uno o ambos de: no inmediatamente contiguo con una o ambas de las secuencias, p. ej., secuencias de codificación, con la cual es inmediatamente contiguo (es decir, una en el extremo de 5' y una en el extremo de 3') en el genoma del organismo que sucede naturalmente del cual se deriva el ácido nucleico; o que es sustancialmente libre de una secuencia del ácido nucleico con la cual sucede en el organismo del cual se deriva el ácido nucleico. El término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector, p. ej., en un plásmido o virus que se duplica autónomamente, o en el ADN genómico de un organismo procariótico o eucariótico no humano, o que existe como molécula separada (p. ej., un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) o por tratamiento de restricción de la endonucleasa) independiente de otras secuencias de ADN. El ADN sustancialmente puro incluye también un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica otra secuencia de la proteína de fusión de EPOa-ASh.  
25  
30

Homología, o identidad secuencial, tal como se usa en este documento, se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas polipéptidas o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido como en la posición correspondiente de la segunda secuencia, entonces las moléculas son homólogas en esa posición (es decir, tal como se usa en este documento, “homología” de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a “identidad” de aminoácidos o ácidos nucleicos). El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = cantidad de posiciones idénticas / cantidad total de posiciones x 100). Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias se hacen corresponder o son homólogas, entonces las dos secuencias tienen una homología del 60% o una identidad secuencial del 60%. Como ejemplo, las secuencias ATTGCC y TATGGC de ADN comparten una homología o identidad secuencial del 50%. Por lo general, se hace una comparación cuando dos secuencias están alineadas y presentan una homología o identidad secuencial máxima.  
35  
40

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no restrictivo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:2264-68, modificado según Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:5873-77. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Una búsqueda de nucleótidos BLAST se puede realizar con el programa NBLAST, puntaje = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias nucleótidas homólogas a las moléculas de ácido nucleico ITALY de la invención. Una búsqueda de proteínas BLAST se puede realizar con el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína ITALY de la invención. Para obtener alineamientos espaciados a título comparativo, se puede utilizar Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo preferido no restrictivo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede aplicar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad por longitud de espaciamiento de 12 y una penalidad por espaciamiento de 4.  
45  
50  
55  
60

En el presente documento, los términos péptidos, proteínas y polipéptidos se utilizan intercambiamente.

Tal como se usa en este documento, el término transgén significa una secuencia de ácido nucleico (que codifica, p. ej., uno o más polipéptidos de la proteína de fusión de EPOa-ASh), que se introduce en el genoma de un organismo transgénico no humano. Un transgén puede incluir una o más secuencias regulatorias transcripcionales y otros ácidos nucleicos, como intrones, que pueden ser necesarios para la expresión y secreción óptimas de un ácido nucleico que  
65

codifica la proteína de fusión. Un transgén puede incluir una secuencia intensificadora. Una secuencia de una proteína de fusión de EPOa-ASh puede estar conectada durante la operación a un promotor específico de tejido, p. ej., la secuencia del promotor específico de la glándula mamaria cuyo resultado es la secreción de la proteína en la leche de un mamífero transgénico no humano, un promotor específico de la orina o un promotor específico del huevo.

5 Tal como se usa en este documento, el término “célula transgénica” se refiere a una célula que contiene un transgén.

Un organismo transgénico no humano, tal como se usa en este documento, se refiere a un animal o planta transgénica no humana.

10 Tal como se usa en este documento, un “animal transgénico no humano” es un animal no humano en el cual una o más, y preferentemente todas las células del animal no humano contienen un transgén introducido mediante la intervención humana, tal como las técnicas transgénicas conocidas en este campo. El transgén puede introducirse en la célula, directa o indirectamente, mediante la introducción de un precursor de la célula, por medio de una manipulación genética deliberada, como por ejemplo con microinyección o con infección por un virus recombinante.

15 Otras características y ventajas de esta invención se pondrán de manifiesto después de considerar la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

## 20 Descripción detallada

Primero se describen los dibujos.

25 La figura 1 es un diagrama esquemático de constructos de la fusión de EPOa-ASh. Los asteriscos indican los sitios de glicosilación de eritropoyetina humana nativa.

La figura 2 es una fotografía del análisis de mancha Western de células *COS7* transfectadas en forma transitoria con constructos de ADNc de EPOa-ASh.

## 30 Glicosilación

35 EPO es una hormona glicoproteica que media en la maduración de células progenitoras de eritroides a eritrocitos. Desempeña un papel importante en la regulación del nivel de hematíes en circulación. El hígado produce naturalmente la EPO durante la vida fetal y en adultos, el riñón y circula en la sangre y estimula la producción de hematíes en la médula ósea.

40 Muchas superficies celulares y proteínas de secreción producidas por las células eucarióticas son modificadas por la conexión de uno o más grupos oligosacáridos. La modificación que se conoce como glicosilación puede afectar radicalmente las propiedades físicas de las proteínas y puede ser importante en la estabilidad, secreción y localización de las proteínas.

45 La glicosilación se suscita en sitios específicos a lo largo del eje polipeptídico. Por lo general, hay dos tipos principales de glicosilación: la glicosilación que se caracteriza por los oligosacáridos con enlace O, que se unen a los residuos de serina o treonina; y la glicosilación que se caracteriza por los oligosacáridos con enlace N, que se unen a los residuos de asparragina en una secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser un aminoácido que no sea prolina. El ácido N-acetil-neuramínico (en adelante, ácido siálico) es, por lo general, el residuo terminal de los oligosacáridos con enlace N y con enlace O.

50 La EPO derivada de la orina humana contiene tres cadenas de oligosacáridos con enlace N y una con enlace O. La glicosilación con enlace N se suscita en los residuos de asparragina en las posiciones 24, 38 y 83, mientras que la glicosilación con enlace O se suscita en un residuo de serina en la posición 126 (Lai *et al. J. Biol. Chem.* 261, 3116 (1986); Broudy *et al, Arch. Biochem. Biophys.* 265, 329 (1988).

55 Tal como se describe en este documento, las EPO análogas de la invención han sido modificadas de manera que se elimine la glicosilación en uno, dos, tres o todos estos sitios, p. ej., por sustitución o delección del residuo de un aminoácido.

## Glicosilación de EPO análoga

60 Una EPO análoga puede ser distinta de una EPO natural o recombinante en uno o más de los siguientes aminoácidos: Asn24, Asn38, Asn83 o Ser126. En una EPOa, la secuencia principal puede cambiarse de manera tal que uno o más de estos residuos no apoye la glicosilación.

65 Análogos preferidos se incluyen en la lista a continuación, donde, Xaa es un aminoácido que no apoya el enlace con un residuo de azúcar. p. ej., Gln o Ala.

	24	38	83	126	
5	Tipo salvaje	Asn	Asn	Asn	Ser
	EPOa-1	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	EPOa-2	Asn	Xaa	Xaa	Xaa
10	EPOa-3	Xaa	Asn	Xaa	Xaa
	EPOa-4	Xaa	Xaa	Asn	Xaa
	EPOa-5	Xaa	Xaa	Xaa	Ser
15	EPOa-6	Asn	Asn	Xaa	Xaa
	EPOa-7	Asn	Xaa	Asn	Ser
20	EPOa-8	Xaa	Asn	Asn	Xaa
	EPOa-9	Xaa	Asn	Asn	Ser
	EPOa-10	Xaa	Xaa	Asn	Ser
25	EPOa-11	Xaa	Asn	Xaa	Ser
	EPOa-12	Asn	Xaa	Asn	Xaa
30	EPOa-13	Asn	Xaa	Asn	Ser
	EPOa-14	Asn	Asn	Asn	Xaa
35	EPOa-15	Asn	Asn	Xaa	Ser

Una EPOa puede ser distinta de una EPO únicamente en uno o más o en todos los sitios 24, 38, 83 y 126 o puede tener otras sustituciones y/o deleciones de aminoácidos tal como se describe abajo.

#### Secuencias de codificación de la proteína de fusión de EPOa-ASh

La fusión preferida de EPOa-ASh tiene una EPOa conectada a una molécula ASH pero existen otras conformaciones en la invención. P. ej., las proteínas de fusión de EPOa-ASh pueden tener cualquiera de las siguientes fórmulas:  $R_1-L-R_2$ ;  $R_2-L-R_1$ ;  $R_1-L-R_2-L-R_1$ ; o  $R_2-L-R_1-L-R_2$ ;  $R_1-R_2$ ;  $R_2-R_1$ ;  $R_1-R_2-R_1$ ; o  $R_2-R_1-R_2$ ; donde  $R_1$  es una EPO análoga,  $R_2$  es ASH, y L es una secuencia de un enlace peptídico.

Los dominios de EPOa y ASh están conectados entre sí, preferentemente por medio de una secuencia de enlace. La secuencia de enlace debe separar a los dominios de EPOa y ASh con una distancia suficiente para asegurarse de que cada dominio pueda plegarse correctamente en sus estructuras secundaria y terciaria. Las secuencias de enlace preferidas (1) deben adoptar una conformación extendida flexible, (2) no deben ser propensas al desarrollo de una estructura secundaria ordenada que pudiera interactuar con los dominios de EPOa y ASh funcionales, y (3) deben tener un carácter hidrofóbico o cargado mínimo que pudiera promover la interacción con los dominios de las proteínas funcionales. Los aminoácidos típicos de superficie en regiones de proteínas flexibles incluyen Gly, Asn y Ser. Las permutaciones de las secuencias de aminoácidos que contienen Gly, Asn y Ser debieran satisfacer los criterios anteriores para una secuencia de enlace. También se pueden usar en la secuencia de enlace otros aminoácidos casi neutros, como Thr y Ala.

Se puede utilizar una secuencia de enlace con una longitud de 20 aminoácidos para proporcionar una separación de dominios de proteínas funcionales adecuada, aunque también se pueden utilizar secuencias de enlaces más cortas o largas. La longitud de la secuencia de enlace que separa la EPOa y la ASH puede ser de 5 a 500 aminoácidos o más, preferentemente de 5 a 100 aminoácidos. Preferentemente, la secuencia de enlace tiene una longitud de aproximadamente 5 a 30 aminoácidos. En realizaciones preferidas, la secuencia de enlace es de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 aminoácidos y favorable de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20 aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos útiles como enlaces de EPOa y ASH incluyen, entre otras,  $(SerGly_4)_n$ , donde n es mayor o igual a 8, o  $Gly_4SerGly_5Ser$ . Una secuencia de enlace preferido tiene la fórmula  $(SerGly_4)_4$ . Otro enlace preferido tiene la secuencia  $((Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)_3-Ser-Pro)$ .

Las proteínas de la EPOa y ASH se pueden fusionar directamente sin una secuencia de enlace. Las secuencias de enlaces son innecesarias cuando las proteínas que se fusionan tienen regiones de aminoácidos con terminales N o C no esenciales que pueden utilizarse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica. En realizaciones preferidas, el término C de la EPOa se puede fusionar directamente con el término N de la ASH, o el término C de la ASH se puede fusionar directamente con el término N de la EPOa.

#### *Producción con recombinante*

Se puede preparar una proteína de fusión de EPOa-ASH con técnicas de ADN recombinante estándar utilizando una molécula de ácido nucleico que codifique la proteína de fusión. Una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión puede sintetizarse por métodos de síntesis de ADN estándar.

Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión puede introducirse en una célula anfitriona, p. ej., una célula de una línea celular primaria o inmortalizada. Las células del recombinante se pueden utilizar para producir la proteína de fusión. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión puede introducirse en una célula anfitriona, p. ej., mediante recombinación homóloga. En la mayoría de los casos, un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de EPOa-ASH se incorpora en un vector de expresión recombinante.

La secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión puede estar conectada durante la operación a una o más secuencias regulatorias, seleccionadas en base a las células anfitrionas que se utilizarán para la expresión. Se entiende por "conectado durante la operación" que las secuencias que codifican el compuesto de la proteína de fusión están conectadas a la(s) secuencia(s) regulatoria(s) de manera tal que permiten la expresión de la proteína de fusión. El término "secuencia regulatoria" se refiere a los promotores, intensificadores y otros elementos de control de expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Tales secuencias regulatorias se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), el contenido del cual se incorpora al presente documento por referencia. Las secuencias regulatorias incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia nucleótida en muchos tipos de células anfitrionas, aquellas que dirigen la expresión de la secuencia nucleótida únicamente en ciertas células anfitrionas (p. ej., secuencias regulatorias específicas de tejido) y aquellas que dirigen la expresión de manera regulatoria (p. ej., únicamente en la presencia de un agente inductor). Aquellos que dominan el campo, apreciarán el hecho que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la selección de la célula anfitriona a transformarse, el nivel de expresión de la proteína de fusión deseado y otros similares. Los vectores de expresión de la proteína de fusión pueden introducirse en las células anfitrionas para producir proteínas de fusión codificadas por ácidos nucleicos.

Pueden diseñarse vectores de expresión recombinante para la expresión de proteínas de fusión en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, las proteínas de fusión se pueden expresar en células bacterianas como *E. coli*, células de insectos (p. ej., en el sistema de expresión del baculovirus), células de levaduras y células de mamíferos. Algunas células anfitrionas adecuadas se discuten en detalle en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Ejemplos de vectores por expresión en levadura *S. cerevisiae* incluye pYepSec1 (Baldari *et al.*, (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, (1987) *Gene* 54:113-123), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores de baculovirus disponibles para expresión de las proteínas de fusión en células cultivadas de insectos (p. ej., células Sf9) incluyen la serie pAc (Smith *et al.*, (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow, V.A., and Summers, M. D., (1989) *Virology* 170:31-39).

Ejemplos de vectores de expresión mamífera incluyen pCDM8 (Seed, B., (1987) *Nature* 329:840) y pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987), *EMBO J.* 6:187-195). Cuando se usan en células mamíferas, las funciones de control del vector de expresión a menudo las proporcionan los elementos virales regulatorios. Por ejemplo, los promotores que se usan normalmente son derivados del poliovirus, adenovirus tipo 2, citomegalovirus y virus simiano 40.

Además de las secuencias de control regulatorio descritas anteriormente, el vector de expresión recombinante puede contener secuencias nucleótidas adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión recombinante puede codificar un gen marcador seleccionable para identificar las células anfitrionas que han incorporado el vector. Además, para facilitar la secreción de la proteína de fusión de una célula anfitriona, especialmente en células anfitrionas mamíferas, el vector de expresión recombinante puede codificar una secuencia de señales conectadas durante la operación a secuencias que codifican el término amino de la proteína de fusión de manera tal que cuando se expresa, la proteína de la fusión se sintetiza con la secuencia de la señal fusionada a su término amino. Esta secuencia de señales dirige la proteína de fusión a la vía de secreción de la célula y luego se divide permitiendo la liberación de la proteína de fusión madura (p. ej., la proteína de fusión sin la secuencia de señales) de la célula anfitriona. El uso de una secuencia de señales para facilitar la secreción de proteínas o péptidos de las células anfitrionas mamíferas es bien conocido en este campo.

El ADN del vector puede introducirse en las células procarióticas o eucarióticas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se usa en este documento, los términos "transformación" y "transfección" se refieren a una variedad de técnicas reconocidas en este campo para la introducción de ácido nucleico foráneo (p. ej., ADN) en una célula anfitriona, incluso coprecipitación de fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextran, lipofección, electroporación, microinyección y transfección mediada por virus. Métodos adecuados para la transformación o transfección de células anfitrionas se encuentran en Sambrook *et al.* (*Molecular*

*Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) y en otros manuales de laboratorio.

A menudo únicamente una pequeña fracción de células mamíferas integra el ADN foráneo en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (p. ej., resistencia a antibióticos) se puede introducir en las células anfitrionas con el gen que codifica la proteína de fusión. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a los fármacos, como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica a un marcador seleccionable puede introducirse en una célula anfitriona en el mismo vector que el que codifica la proteína de fusión o en un vector separado. Las células transfectadas estables con la introducción del ácido nucleico pueden identificarse por la selección del fármaco (p. ej., las células que tienen incorporado un gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células se morirán).

Un vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, utilizando secuencias regulatorias del promotor T7 y polimerasa T7.

#### Mamíferos transgénicos

Los métodos para generar animales transgénicos no humanos se describen en este documento. Los constructos de ADN pueden introducirse en la línea germinal de un mamífero no humano para crear un mamífero transgénico no humano. Por ejemplo, una o varias copias del constructo pueden incorporarse en el genoma del embrión mamífero no humano por medio de técnicas transgénicas estándar.

A menudo es conveniente expresar la proteína transgénica en la leche de un mamífero transgénico no humano. Se prefieren mamíferos no humanos que producen gran cantidad de leche y que tienen un período de lactancia prolongado. Mamíferos no humanos preferidos son los rumiantes, p. ej., vacas, ovejas, camellos o cabras, p. ej., cabras de origen suizo, p. ej., cabras de raza Alpina, Saanen y Toggenburg. Otros animales preferidos incluyen los bueyes, los conejos y los cerdos.

En una realización ejemplar, un animal transgénico no humano se produce por medio de la introducción de un transgén en la línea germinal del animal no humano. Los transgenes pueden introducirse en las células blanco embrionales no humanas en varias etapas de desarrollo. Se utilizan diferentes métodos dependiendo de la etapa de desarrollo de la célula blanco embrional no humana. De ser posible, las líneas específicas de un animal no humano debieran seleccionarse en general por buena salud, buen rendimiento de embriones, buena visibilidad pronuclear en el embrión y buena capacidad de reproducción.

La introducción del transgén de la proteína de fusión de EPOa-ASh en el embrión no humano puede lograrse por diferentes medios conocidos en el campo, tal como microinyección, electroporación o lipofección. Por ejemplo, un transgén de la proteína de fusión de EPOa-ASh se puede introducir en un mamífero no humano mediante microinyección del constructo en los pronúcleos de los huevos fertilizados de mamíferos para producir una o más copias del constructo a ser retenido en las células del mamífero no humano en desarrollo. Después de la introducción del constructo del transgén en un huevo fertilizado, el huevo se puede incubar *in vitro* durante un tiempo variado o reimplantar en la anfitriona suplente o de alquiler no humana, o ambos. Otro método común es incubar *in vitro* los embriones no humanos durante aproximadamente 1 a 7 días, dependiendo de la especie, y luego reimplantarlos en la anfitriona suplente no humana.

Se pueden hacer pruebas en la progenie de los embriones no humanos manipulados transgénicamente para determinar la presencia del constructo por medio del análisis de mancha Southern de un segmento tisular. Puede utilizarse un embrión no humano con una o más copias del constructo clonado exógeno integrado en forma estable en el genoma para establecer una línea mamífera transgénica permanente que acarrea el constructo agregado transgénicamente.

La cría de los mamíferos no humanos alterados transgénicamente se puede evaluar después del nacimiento con respecto a la incorporación del constructo en el genoma de la cría. Esto se puede realizar hibridando una sonda correspondiente a la codificación de la secuencia de ADN para la proteína de fusión o un segmento de la misma en el material cromosómico de la progenie. La progenie mamífera no humana que contiene por lo menos una copia del constructo en su genoma se cría hasta su madurez. Las especies femeninas no humanas de esta progenie producirán la proteína deseada en la leche o junto con ella. Los mamíferos transgénicos no humanos pueden reproducirse para producir otra progenie transgénica no humana útil en la producción de las proteínas deseadas en su leche.

Se pueden realizar pruebas en las hembras transgénicas no humanas para determinar la secreción de proteínas en la leche, utilizando una técnica de ensayo conocida en el campo, p. ej., una mancha Western o un ensayo enzimático.

#### *Producción de proteína transgénica en la leche de un animal transgénico*

##### *Promotores específicos de la leche*

Promotores transcripcionales útiles son aquellos promotores que se activan preferentemente en las células epiteliales mamarias, incluso los promotores que controlan los genes que codifican las proteínas de la leche como las caseínas, beta lactoglobulina (Clark *et al.*, (1989) *Bio/Technology* 7:487-492), proteína del ácido sérico (Gorton *et al.* (1987)

## ES 2 273 497 T3

*Bio/Technology* 5:1183-1187), y lactoalbúmina (Soulier *et al.*, (1992) *FEBS Letts.* 297:13). Se puede utilizar el promotor del gen de la caseína alfa, beta, gamma o kappa de cualquier especie de mamífero para proporcionar una expresión mamaria; un promotor preferido es el promotor del gen de la caseína beta caprina (DiTullio, (1992) *Bio/Technology* 10:74-77). El promotor de la proteína específica de la leche o los promotores que se activan específicamente en el tejido mamario se puede aislar del ADNc o de las secuencias genómicas. Preferentemente, son de origen genómico.

La información de la secuencia de ADN para los genes específicos de la glándula mamaria mencionados arriba, se encuentra en por lo menos uno y a menudo en varios organismos. Ver, p. ej., Richards *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256, 526-532 (1981) (rata,  $\alpha$ -lactalbúmina); Campbell *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12, 8685-8697 (1984) (rata, proteína ácida del suero); Jones *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260, 7042-7050 (1985) (rata,  $\beta$ -caseína); Yu-Lee & Rosen, *J. Biol. Chem.* 258, 10794-10804 (1983) (rata,  $\gamma$ -caseína); Hall, *Biochem. J.* 242, 735-742 (1987) ( $\alpha$ -lactalbúmina humana); Stewart, *Nucleic Acids Res.* 12, 389 (1984) (ADNc caseínas  $\alpha$ sl y  $\kappa$ -bovina); Gorodetsky *et al.*, *Gene* 66, 87-96 (1988) ( $\beta$  caseína bovina); Alexander *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 178, 395-401 (1988) ( $\kappa$ -caseína bovina); Brignon *et al.*, *FEBS Lett.* 188, 48-55 (1977) ( $\alpha$ S2 caseína bovina); Jamieson *et al.*, *Gene* 61, 85-90 (1987), Ivanov *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 425-429 (1988) Alexander *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17, 6739 (1989) ( $\beta$  lactoglobulina bovina); Vilotte *et al.*, *Biochimie* 69, 609-620 (1987) ( $\alpha$ -lactalbúmina bovina). La estructura y función de los distintos genes de la proteína de leche se estudian en Mercier & Vilotte, *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098 (1993) (incorporado por referencia en su totalidad para cualquier propósito). Si las secuencias flanqueadas adicionales son útiles en la optimización de la expresión, dichas secuencias se pueden clonar utilizando las secuencias existentes como ensayos. Las secuencias regulatorias específicas de la glándula mamaria de diferentes organismos se pueden obtener evaluando bibliotecas de dichos organismos utilizando secuencias nucleótidas relacionadas o anticuerpos para relacionar las proteínas como ensayos.

### Secuencias de señales

Las secuencias de señales útiles son secuencias de señales específicas de la leche u otras secuencias de señales que secretan proteínas eucarióticas o procarióticas. Preferentemente, la secuencia de la señal se selecciona de las secuencias de señales específicas de la leche, p. ej., es de un gen que codifica un producto que se secreta en la leche. Con preferencia, la secuencia de la señal específica de la leche se relaciona con el promotor específico de la leche utilizado en el sistema de expresión de esta invención. El tamaño de la secuencia de señal no es crítico para esta invención. Todo lo que se requiere es que la secuencia tenga un tamaño suficiente para que se produzca la secreción de la proteína recombinante deseada, p. ej., en el tejido mamario. Por ejemplo, las secuencias de señales de los genes que codifican las caseínas, p. ej., las caseínas alfa, beta, gamma o kappa, la beta lactoglobulina, la proteína del ácido sérico y la lactoalbúmina, son útiles en esta invención. Una secuencia de señal preferida es la secuencia de señal de  $\beta$  caseína caprina.

También se pueden usar las secuencias de señales de otras proteínas secretadas, p. ej., proteínas secretadas por las células hepáticas, células renales o células pancreáticas

### Constructos de ADN

Una proteína de fusión de EPOa-Ash se puede expresar de un constructo que incluye un promotor específico para células epiteliales mamarias, p. ej., un promotor de caseína, p. ej., un promotor de caseína beta caprina, una secuencia de señal específica de la leche, p. ej., una secuencia de señal de la caseína, p. ej., una secuencia de señal de caseína  $\beta$ , y un ADN que codifica una proteína de fusión de EPOa-Ash.

Un constructo también puede incluir una región no traducida 3' corriente abajo de la codificación de la secuencia de ADN para la proteína no secretada. Tales regiones pueden estabilizar la transcripción del ARN del sistema de expresión y así aumenta la producción de la proteína deseada del sistema de expresión. Entre las regiones no traducidas 3' útiles en los constructos de esta invención se encuentran las secuencias que proporcionan una señal de poliadenilación. Dichas secuencias pueden derivarse, p. ej., del antígeno t del virus SV40, la región no traducida 3' de la caseína u otras secuencias no traducidas 3' bien conocidas en este campo. Preferentemente, la región no traducida 3' se deriva de una proteína específica de la leche. La longitud de la región no traducida 3' no es crítica, pero el efecto estabilizante de la transcripción de su señal de poliadenilación parece ser importante en la estabilización de ARN de la secuencia de expresión.

Un constructo puede incluir una región no traducida 5' entre el promotor y la secuencia ADN que codifica la secuencia de la señal. Dichas regiones no traducidas pueden ser de la misma región de control de la cual se toma el promotor o pueden ser de un gen diferente, p. ej., se pueden derivar de otras fuentes sintéticas, semisintéticas o naturales. Nuevamente, su longitud específica no es crítica; no obstante, parecen ser útiles para mejorar el nivel de expresión.

Un constructo también puede incluir alrededor del 10%, 20%, 30% o más de la región de codificación de la terminal N de un gen, preferentemente expresado en células epiteliales mamarias. Por ejemplo, la región de codificación de la terminal N puede corresponder al promotor utilizado, p. ej., una región de codificación de la terminal N de caseína  $\beta$  caprina.

Métodos anteriores en este campo pueden incluir la creación de un constructo y su evaluación para determinar su capacidad para producir un producto en células cultivadas antes de colocar el constructo en un animal transgénico no humano. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que dicho protocolo puede no tener valor predictivo para determinar si una proteína no secretada normalmente puede secretarse, p. ej., en la leche de un animal transgénico no humano. Por lo tanto, puede ser conveniente evaluar los constructos directamente en animales transgénicos no humanos, p. ej., ratones transgénicos, ya que algunos constructos que no se secretan en células CHO se secretan en la leche de animales transgénicos no humanos.

#### *Purificación de leche*

La proteína transgénica puede producirse en leche en concentraciones relativamente altas y en grandes cantidades, siempre y cuando se provea una alta producción continua de péptidos procesados normalmente que se puedan cosechar fácilmente de un recurso renovable. Existen varios métodos diferentes conocidos en este campo para el aislamiento de las proteínas lácteas.

Las proteínas lácteas generalmente se aíslan por medio de una combinación de procesos. Se fracciona la leche no pasteurizada para extraer las grasas, por ejemplo, por medio del desnatado, centrifugación, sedimentación (H. E. Swaisgood, *Developments in Dairy Chemistry, I: Chemistry of Milk Protein*, Applied Science Publishers, NY, 1982), precipitación del ácido (Patente de EE.UU. N° 4,644,056) o coagulación enzimática con renina o quimotripsina (Swaisgood, *ibid.*). Luego, se pueden fraccionar las proteínas lácteas principales en una solución clara o un precipitado por volumen del cual se puede purificar fácilmente la proteína de interés específico.

USSN 08/648,235 explica un método para aislar un componente lácteo soluble, como un péptido, en su forma activa biológica de la leche entera o de una fracción de leche por medio del filtrado de flujo tangencial. Al contrario de los métodos de aislamiento previos, esto elimina la necesidad de un primer fraccionado de la leche entera para extraer las micelas de grasa y caseína, simplificando de esta manera el proceso y evitando las pérdidas de recuperación y bioactividad. Este método se puede utilizar en combinación con otros pasos de purificación para extraer aún más contaminantes y purificar el componente de interés.

#### *Producción de proteína transgénica en los huevos de un animal transgénico no humano*

Se puede producir una proteína de fusión de EPOa-ASH en tejidos, secreciones u otros productos, p. ej., un huevo de un animal transgénico no humano. La EPOa-ASH puede producirse en los huevos de un animal transgénico no humano, preferentemente un pavo, pato, ganso, avestruz, gallina de Guinea, pavo real, perdiz, faisán, paloma transgénico y con preferencia una gallina transgénica, por medio de métodos conocidos en el campo (Sang *et al.*, *Trends Biotechnology*, 12:415-20, 1994). Los genes que codifican las proteínas expresadas específicamente en el huevo, como ser los genes de la proteína de la yema y genes de la proteína de la albúmina pueden ser modificados para la expresión directa de EPOa-ASH.

#### *Promotores específicos del huevo*

Promotores transcripcionales útiles son aquellos promotores que se activan preferentemente en el huevo, incluso los promotores que controlan los genes que codifican las proteínas del huevo, p. ej., ovalbúmina, lisozima y avidina. Se prefieren los promotores de los genes de la ovalbúmina, lisozima o avidina de la gallina. El promotor o los promotores de la proteína específica del huevo que se activan específicamente en el tejido del huevo pueden ser del ADNc o de las secuencias genómicas. Preferentemente, los promotores específicos del huevo son de origen genómico.

Las secuencias de ADN de genes específicos del huevo son conocidas en este campo (ver, p. ej., Burley *et al.*, "The Avian Egg", John Wiley and Sons, p.472, 1989, el contenido del cual se incorpora al presente documento por referencia). Si las secuencias flanqueadas adicionales son útiles en la optimización de la expresión, dichas secuencias se pueden clonar utilizando las secuencias existentes como ensayos. Las secuencias regulatorias específicas del huevo de diferentes organismos se pueden obtener evaluando bibliotecas de dichos organismos utilizando secuencias nucleótidas conocidas o anticuerpos para relacionar las proteínas como ensayos.

#### *Plantas transgénicas*

Una proteína de fusión de EPOa-ASH puede expresarse en un organismo transgénico no humano, p. ej., una planta transgénica en la cual se introduce un transgén de ADN en el genoma nuclear o plasmídico. La transformación de la planta es bien conocida en este campo. Ver, en general, *Methods in Enzymology* Vol.153 ("Recombinant DNA Part D") 1987, Wu and Grossman Eds., Academic Press y solicitud de patente europea EP 693554.

El ácido nucleico foráneo puede introducirse en las células o protoplastos de la planta por medio de diferentes métodos. Por ejemplo, el ácido nucleico puede transferirse mecánicamente por microinyección directamente a las células de la planta con micropipetas. El ácido nucleico foráneo también se puede transferir a la célula de una planta con glicol polietilénico que forma un complejo de precipitación con el material genético utilizado por la célula (Paszowski *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2712-22). El ácido nucleico foráneo puede introducirse en la célula de una planta por electroporación (Fromm *et al.* (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 82:5824). Con esta técnica, los protoplastos de la planta se electroporan en la presencia de plásmidos o ácidos nucleicos que contienen el constructo genético relevante.

Los impulsos eléctricos de alta intensidad de campo permeabilizan las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos electroporados de la planta reforman la pared de la célula, la dividen y forman una callosidad en la planta. La selección de las células de la planta transformada con el gen transformado puede lograrse con el uso de marcadores fenotípicos.

5

El virus del mosaico de la coliflor (CaMV) se puede utilizar como vector para introducir un ácido nucleico foráneo en las células de la planta (Hohn *et al.* (1982) "Molecular Biology of Plant Tumors," Academic Press, New York, pág. 549-560; Howell, Patente de EE.UU. N° 4,407,956). El genoma del ADN viral del CaMV se inserta en un plásmido bacteriano original creando una molécula de ADN recombinante que se pueda propagar en bacteria. El plásmido recombinante puede ser modificado aún más con la introducción de la secuencia de ADN deseada. La porción viral modificada del plásmido recombinante se extrae entonces del plásmido bacteriano original y se lo utiliza para inocular las plantas o las células de las plantas.

10

Se puede utilizar la penetración balística de alta velocidad con partículas pequeñas para introducir ácido nucleico foráneo en las células de las plantas. El ácido nucleico se sitúa en la matriz de partículas pequeñas o en la superficie (Klein *et al.* (1987) *Nature* 327:70-73). Aunque normalmente sólo se requiere una sola introducción de un nuevo segmento de ácido nucleico, este método también permite introducciones múltiples.

15

Un ácido nucleico puede ser introducido en una célula de la planta por infección de una de las células de la planta, un explante, un meristema o una semilla con *Agrobacterium tumefaciens* transformado con el ácido nucleico. En condiciones apropiadas, las células de la planta transformada se cultivan para formar brotes, raíces y para desarrollarse como plantas. Los ácidos nucleicos pueden introducirse en las células de plantas, por ejemplo, por medio del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido Ti se transmite a las células de la planta después de la infección por *Agrobacterium tumefaciens*, y se integra en forma estable en el genoma de la planta (Horsch *et al.* (1984) "Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants," *Science* 233:496-498; Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80:4803).

20

25

Las plantas de las que se pueden aislar y cultivar los protoplastos para producir plantas regeneradas completas, pueden transformarse de manera tal que se recuperen plantas completas que contienen el gen foráneo transferido. Algunas plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Ciohorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hemerocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum* y *Datura*.

35

La regeneración de plantas a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans *et al.*, "Protoplasts Isolation and Culture," *Handbook of Plant Cell Cultures* 1:124-176 (MacMillan Publishing Co. New York 1983); M. R. Davey, "Recent Developments in the Culture and Regeneration of Plant Protoplasts," *Protoplasts* (1983)-Lecture Proceedings, pág. 12-29, (Birkhauser, Basal 1983); P. J. Dale, "Protoplast Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops," *Protoplasts* (1983) Lecture Proceedings, pág. 31-41, (Birkhauser, Basel 1983); y H. Binding, "Regeneration of Plants," *Plant Protoplasts*, pág. 21-73, (CRC Press, Boca Raton 1985).

40

La regeneración a partir de protoplastos varía de una especie de planta a otra, pero por lo general se genera primero una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias de la secuencia exógena. En algunas especies, entonces se puede inducir la formación del embrión en la suspensión del protoplasto, hasta la etapa de madurez y germinación como embriones naturales. El medio de cultivo puede contener varios aminoácidos y hormonas, tal como auxinas y citoquininas. También puede ser ventajoso agregar al medio ácido glutámico y prolina, especialmente en especies tales como maíz y alfalfa. Los brotes y raíces normalmente se desarrollan simultáneamente. La regeneración eficiente dependerá del medio, del genotipo y de los antecedentes del cultivo. Cuando se controlan estas tres variables, entonces la regeneración se puede reproducir y repetir completamente.

50

En cultivos propagados vegetativamente, las plantas transgénicas maduras se pueden propagar con esquejes o con técnicas de cultivo tisular para producir múltiples plantas idénticas para estudios, tal como la determinación de las características de producción. Se selecciona una planta transgénica deseable y se obtienen nuevas variedades de la misma, y se propagan vegetativamente para ventas comerciales. En los cultivos propagados por semillas, las plantas transgénicas maduras se pueden autogerminar para producir una planta endogámica homocigota. La planta endogámica produce semillas que contienen el gen para el nuevo nivel de actividad del gen foráneo introducido. Estas semillas se pueden cultivar para producir plantas que tengan el fenotipo seleccionado. Según esta invención las plantas endogámicas se pueden utilizar para desarrollar híbridos nuevos. En este método, una línea endogámica seleccionada se germina con otra línea endogámica para producir el híbrido.

55

60

Las partes obtenidas de una planta transgénica, como las flores, semillas, hojas, ramas, frutos y otras similares, están cubiertas por la invención, siempre y cuando estas partes incluyan células que hayan sido transformadas de esta manera. La progenie y variaciones, y los mutantes de las plantas regeneradas también se incluyen dentro del alcance de esta invención, siempre y cuando estas partes comprendan las secuencias de ADN introducidas. La progenie y variaciones, y los mutantes de las plantas regeneradas también se incluyen dentro del alcance de esta invención.

65

## ES 2 273 497 T3

La selección de las plantas o células de plantas transgénicas puede basarse en un ensayo visual, como ser la observación de los cambios de colores (p. ej., una flor blanca, producción de pigmentación variable y patrón de color uniforme en las flores o patrones irregulares), pero puede también abarcar ensayos bioquímicos de la actividad enzimática o de la cuantificación del producto. Las plantas o las células de plantas transgénicas se cultivan para formar plantas que contienen la parte de la planta de interés y se observan las actividades del gen mediante la determinación de su aspecto visual (para los genes flavonoides) o mediante ensayos bioquímicos (manchas Western); manchas Western; ensayos enzimáticos y ensayos de compuestos flavonoides, incluso espectroscopía, ver Harborne *et al.* (Eds.), (1975) *The Flavonoids*, Vol. 1 y 2, [Acad. Press]). Se seleccionan plantas apropiadas y se evalúan en más detalle. Los métodos para la generación de plantas diseñadas genéticamente se describen en detalle en la patente de EE.UU. N° 5,283,184, patente de EE.UU. N° 5,482,852 y en la solicitud de patente europea EP 693 554.

### *Otros tipos de eritropoyetina análoga*

Preferentemente, los tipos de EPO análoga tienen uno o más cambios en los siguientes aminoácidos: Asn24, Asn38, Asn83 o Ser126. Los tipos de EPO análoga también pueden tener otros cambios en los aminoácidos, tal como se detalla abajo.

En una realización preferida, la EPOa difiere en la secuencia del aminoácido hasta en 1, 2, 3, 5 ó 10 residuos, comparado con la secuencia donde se produce naturalmente la proteína de la EPO. Estos cambios pueden ser además de los cambios en Asn24, Asn38, Asn83, y Ser126. En otras realizaciones preferidas, la EPOa difiere en la secuencia del aminoácido hasta en 1, 2, 3, 5 ó 10% de los residuos comparado con una secuencia donde se produce naturalmente la proteína de la EPO. Estos cambios pueden ser además de los cambios en Asn24, Asn38, Asn83, y Ser126. En una realización preferida, las diferencias son tales que la eritropoyetina análoga muestra una actividad biológica de la eritropoyetina cuando se fusiona con la ASH. En realizaciones preferidas, una o más o todas las diferencias son cambios aminoacídicos conservadores. En otras realizaciones preferidas, una o más o todas las diferencias son otros cambios aparte de los aminoacídicos conservadores.

En realizaciones preferidas, la EPOa es un fragmento, p. ej., una fragmento terminal de una secuencia de la cual se ha borrado una subsecuencia de intervalo de un segmento completo de eritropoyetina.

En realizaciones preferidas: el fragmento tiene por lo menos 50, 60, 80, 100 ó 150 aminoácidos de longitud; el fragmento tiene una actividad biológica de una eritropoyetina que ocurre naturalmente; el fragmento es un agonista o un antagonista de una actividad biológica de una eritropoyetina que ocurre naturalmente; el fragmento puede inhibir, p. ej., inhibir competitivamente o no competitivamente, la fijación de la eritropoyetina a un receptor.

En realizaciones preferidas, el fragmento tiene por lo menos 60, y con preferencia una identidad de secuencia de por lo menos el 70, 80, 90, 95, 99 ó 100% con su correspondiente secuencia de aminoácido de una eritropoyetina que ocurre naturalmente.

En realizaciones preferidas, el fragmento es un fragmento de un vertebrado, p. ej., un mamífero, p. ej., un primate, p. ej., una eritropoyetina humana.

En una realización preferida, el fragmento difiere en la secuencia del aminoácido hasta en 1, 2, 3, 5 ó 10 residuos, comparado con los residuos correspondientes de la eritropoyetina que ocurre naturalmente. Estos cambios pueden ser además de los cambios en Asn24, Asn38, Asn83, y Ser126. En otras realizaciones preferidas, el fragmento difiere en la secuencia del aminoácido hasta en 1, 2, 3, 5 ó 10% de los residuos, comparado con los residuos correspondientes de la eritropoyetina que ocurre naturalmente. Estos cambios pueden ser además de los cambios en Asn24, Asn38, Asn83, y Ser126. En realizaciones preferidas, las diferencias son tales que el fragmento muestra la actividad biológica de la eritropoyetina cuando se fusiona con la ASH. En realizaciones preferidas, una o más o todas las diferencias son cambios aminoacídicos conservadores. En otras realizaciones preferidas, una o más o todas las diferencias son otros cambios aparte de los aminoacídicos conservadores.

Los polipéptidos de la invención incluyen aquellos que surgen como resultado de eventos traslacionales y postraslacionales.

En este campo se conocen numerosos tipos de EPO análoga. La estructura y actividad principal de estas variantes puede servir como guía para la introducción de otros cambios (además de los cambios que modifican la glicosilación) en una EPOa. Deben evitarse los cambios que reducen la actividad o que crean sitios de glicosilación.

Algunos de los tipos de EPO análoga conocidos en este campo se resumen en la Tabla 1 a continuación.

## ES 2 273 497 T3

TABLA 1

Mutación de la EPO	Loc.	Tipo	Efecto	Fuente	Referencia
Pro-Asn	2	Sustitución	La actividad biológica no aumenta.	EPOh	US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	2-6	Delección	La actividad biológica no aumenta.	EPOh	US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
Cys-His	7	Sustitución	Elimina la actividad biológica.	EPOh	US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
Tyr-Phe	15	Sustitución	La actividad biológica no aumenta.	EPOh	US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	15	Sustitución o delección	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		WO 9425055 Abbott Labs.
Asn-?	24	Sustitución	Reduce la actividad biológica.	EPOh	WO 9425055 Abbott Labs.
	24	Sustitución o delección	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		WO 9425055 Abbott Labs.
	27-55	Delección	La actividad biológica no aumenta.	EPOh	US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
Cys-Pro	33	Sustitución	Pérdida de actividad <i>in vitro</i> . El enlace del disulfuro entre Cys29 y Cys33 es esencial para la función.	EPOh	WO 9425055 Abbott Labs.
Asn-?	38	Sustitución	Degradación y falta de secreción intracelular.	EPOh	WO 9425055 Abbott Labs.
Tyr-Phe	49	Sustitución	La actividad biológica no aumenta.	EPOh	US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	49	Sustitución o delección	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		WO 9425055 Abbott Labs.

ES 2 273 497 T3

5	Met-?	54	Sustitución	Retiene la actividad <i>in vivo</i> y es menos susceptible a oxidación.	EPOh	US 4835260 Genetics Institute, Inc
10	Met-Leu	54	Sustitución	Retiene la actividad biológica.	EPOh	US 4835260 Genetics Institute, Inc
15	Leu-Asn	69	Sustitución	Crea un sitio de glicosilación N adicional.		EP 0428267B1 AMGEN
20		76	Sustitución o delección	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
25		78	Sustitución o delección	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
30		83	Sustitución o delección	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
35	Dominio1	99-119	Delección	Se degrada e inactiva rápidamente <i>in vitro</i> .		WO 9425055 Abbott Labs.
40	Dominio2	111 129	Delección	Retiene la actividad <i>in vitro</i> .		
45	Ala-Pro	124	Doble sustitución	Crea sitios de glicosilación N y O adicionales.		EP 0428267B1 AMGEN
50	Ala-Thr	125	Sustitución	Crea un sitio de glicosilación O adicional.		EP 0428267B 1 AMGEN
55	Ala-Asn	125	Doble sustitución	Crea un sitio de glicosilación N adicional.		EP 0428267B1 AMGEN
60	Ala-Ser	127		Crea un sitio de glicosilación O adicional.		
65	Ser-?	126	Sustitución	Degradación rápida o falta de secreción.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	Cys-Pro	33	Doble sustitución	Pérdida de actividad.		WO 9425055 Abbott Labs.
	Entonces					

ES 2 273 497 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Arg-Cys	139		Restaura y mejora la actividad <i>in vivo</i> .		
	143	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
Tyr-Phe	145	Sustitución	La actividad biológica no aumenta.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	145	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	160	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	161	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	162	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	163	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	164	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	165	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	166	Sustitución o deleción	Retiene la actividad <i>in vivo</i> en los animales pero no hay aumento en los precursores de la EPO.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
	163 166	Deleción	La actividad biológica no aumenta.		US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.

Ser-?	183	Sustitución	Degradación y falta de secreción intracelular.	US 4703008 Kiren-Amgen, Inc.
-------	-----	-------------	--	------------------------------------

Aunque la ASH es la unidad asociada preferida para la fusión, se pueden utilizar otros polipéptidos. Preferentemente, estos son polipéptidos que no respaldan la glicosilación. La frase "no respaldan la glicosilación" tal como se la utiliza en este documento, se refiere a los polipéptidos que no respaldan naturalmente la glicosilación y a los polipéptidos que se han modificado de manera que no respaldan la glicosilación. Por ejemplo, el asociado de fusión puede ser un fragmento soluble de Ig, preferentemente un fragmento soluble de Ig modificado de manera tal que no respalda la glicosilación.

En cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la mitad ASH de una fusión se puede reemplazar con otra proteína, preferentemente una proteína, p. ej., una proteína plasmática o fragmento de la misma, que puede mejorar la vida media circulante de la EPO o una EPOa. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de la inmunoglobulina (Ig) de EPOa en donde la secuencia de la EPOa se fusiona con una secuencia derivada de la superfamilia de la inmunoglobulina. Varios constructos de proteína de fusión soluble se han divulgado donde el dominio extracelular de la glicoproteína de la superficie celular se fusiona con la región F(c) constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, Capon *et al.* (1989) *Nature* 337(9):525-531, proporciona una guía para generar un CD4 análogo que dura más tiempo al fusionar CD4 a una inmunoglobulina (IgG). Ver también, Capon *et al.*, patentes de EE.UU. N° 5,116,964 y 5,428,130 (constructos de fusión CD4-IgG); Linsley *et al.*, patente de EE.UU. N° 5,434,131 (constructos de fusión CTLA4-IgG1 y B7-IgG1); Linsley *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174:561-569 (constructos de fusión CTLA4-IgG1); y Linsley *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:721-730 (constructos de fusión CD28-IgG1 y B7-IgG1). Tales proteínas de fusión han demostrado ser útiles para modular las interacciones ligando-receptor y reducir la inflamación *in vivo*. Por ejemplo, se han utilizado *in vivo* proteínas de fusión en donde un dominio extracelular de las proteínas de la superficie celular del receptor del factor de necrosis tumoral (RFNT) se ha fusionado con la región constante de una inmunoglobulina (Fc). Ver, por ejemplo, Moreland *et al.* (1997) *N. Engl. J. Med.* 337(3):141-147; y van der Poll *et al.* (1997) *Blood* 89(10):3727-3734).

#### Composiciones farmacéuticas

Se puede incorporar una proteína de fusión de EPOa-ASH o ácido nucleico a una composición farmacéutica útil para tratar, p. ej., inhibir, atenuar, prevenir o mejorar, una condición que se caracteriza por un nivel insuficiente de actividad de la EPO, incluso condiciones donde el nivel de actividad de la EPO es normal (pero todavía insuficiente) y aquellos en que está por debajo de lo normal.

Preferentemente, la preparación de la invención se administrará a un sujeto que sufre insuficiencia renal, enfermedad crónica, infección por el VIH, pérdida de sangre o cáncer o a un paciente preoperatorio. Las composiciones deben contener una cantidad terapéutica o profiláctica de la proteína de fusión de EPOa-ASH producida en forma recombinante, en un portador farmacéuticamente aceptable o en la leche del animal transgénico no humano. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica capaz de transferir los polipéptidos al paciente. Se puede usar como portador agua estéril, alcohol, grasas, ceras o sólidos inertes. También se pueden incorporar a las composiciones farmacéuticas adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes tampón, agentes de dispersión y otros similares. El portador puede combinarse con la proteína de fusión de EPO-ASH de un modo que sea conveniente para la administración por inyección (por lo general, intravenosa o subcutánea) o de otro modo. Los portadores adecuados para administración intravenosa incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La concentración del péptido producido transgénicamente u otro agente activo en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,1% por peso, siendo generalmente por lo menos aproximadamente 1% por peso, hasta un máximo de 20% por peso o más.

Para la administración intravenosa de la proteína de fusión de EPO-ASH, la composición debe ser estéril y debe ser lo suficientemente fluida para administrarse fácilmente con jeringa. Debe ser estable en condiciones de producción y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr con varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parbens, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y otros similares. En muchos casos, sería preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse con la inclusión de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración oral, el ingrediente activo se puede administrar en una dosificación sólida, tal como cápsulas, tabletas o polvos, o bien en dosificación líquida, como elixires, jarabes o suspensiones. Los componentes activos pueden encapsularse en cápsulas de gelatina junto con los ingredientes inactivos y portadores en polvo, tal como glucosa, lactosa, sucrosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de la celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y otros similares. Ejemplos de otros ingredientes inactivos que se pueden añadir

para proporcionar color, sabor, estabilidad, capacidad de tamponado, dispersión u otras características deseables son el óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato sódico, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y otros similares. Otros diluyentes similares se pueden utilizar para fabricar tabletas comprimidas. Tanto las tabletas como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación sostenida para la liberación continua del medicamento durante un período de horas. Las tabletas comprimidas pueden estar recubiertas de azúcar o de una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y para protegerlas de la atmósfera, o con cubierta entérica para la desintegración en forma selectiva en el tracto gastrointestinal. La dosificación líquida para administración oral puede contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente.

Para la administración nasal, los polipéptidos se pueden formular como aerosoles. El término “aerosol” incluye cualquier fase de los compuestos de la invención instantánea suspendida en gas que pueda ser inhalada en los bronquiolos o pasajes nasales. Específicamente, el aerosol incluye las microgotas de los compuestos de la invención instantánea suspendidas en gas, como se podrían producir en un inhalador de dosis medida o nebulizador, o en un rociador. El aerosol incluye también el polvo seco de la composición de un compuesto de la invención instantánea suspendido en aire u otro gas portador que puede transferirse por ejemplo, por medio de la insuflación de un inhalador. Ver Ganderton & Jones, *Drug Delivery to the Respiratory Tract*, Ellis Horwood (1987); Gonda (1990) *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6:273-313; y Raeburn *et al.* (1992) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 27:143-159.

La dosificación de las proteínas de fusión de EPO-ASh de la invención puede variar levemente de uno a otro individuo, dependiendo del péptido en particular y su actividad específica *in vivo*, vía de administración, condición médica, edad, peso o sexo del paciente, las sensibilidades del paciente a la proteína de fusión de EPO-ASh o componentes del medio, y otros factores que el médico tratante será capaz de tomar en consideración.

La EPOa-ASh se puede proporcionar en un envase estéril que incluye una solución de diálisis o en un envase estéril, p. ej., una bolsa con solución salina, sangre, plasma o sustituto de sangre, u otro componente para administrar al paciente.

#### *Nutracéuticos*

La proteína de fusión de EPOa-ASh puede incluirse en un nutracéutico. Preferentemente, incluye la leche o el producto de la leche obtenido de un mamífero transgénico no humano que expresa la proteína de fusión. Puede incluir una planta o el producto de una planta obtenido de una planta transgénica que expresa la proteína de fusión. La proteína de fusión se puede proporcionar en polvo o en tabletas, con o sin otros aditivos, portadores, rellenos y diluyentes conocidos. Los nutracéuticos se describen en Scott Hegenhart, Food Product Design, Dec. 1993. El nutracéutico puede ser leche maternizada para niños. Puede incluir componentes de una planta transgénica que produce una proteína de fusión de EPOa-ASh.

#### *Terapia de genes*

Los constructos de EPOa-ASh pueden usarse como parte de un protocolo de genoterapia para transferir ácidos nucleicos codificando una proteína de fusión de EPOa-ASh.

Un método preferido para la introducción *in vivo* del ácido nucleico en una célula es utilizando un vector viral que contenga el ácido nucleico codificando la proteína de fusión de EPO-ASh. La infección de las células con un vector viral tiene la ventaja que una gran proporción de las células blanco pueden recibir el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas dentro del vector viral, p. ej., por un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficientemente en células que han adquirido el ácido nucleico del vector viral.

Los vectores de retrovirus y vectores de virus adenoasociados se pueden usar como sistema de transferencia de genes recombinantes para la transferencia de moléculas de ácido nucleico exógeno codificando la proteína de fusión de EPOa-ASh *in vivo*. Estos vectores proporcionan una transferencia eficiente de los ácidos nucleicos en las células, y los ácidos nucleicos transferidos están integrados en forma estable en el ADN cromosómico de la anfitriona. El desarrollo de líneas celulares especializadas (conocidas como “packaging cells” en inglés) que producen únicamente retrovirus de replicación defectuosa ha aumentado la utilidad de los retrovirus para genoterapia, y los retrovirus defectuosos están caracterizados para usar en la transferencia de genes con fines genoterapéuticos (para un repaso, ver Miller, (1990) *Blood* 76:271). Un retrovirus de replicación defectuosa puede empaquetarse en viriones que se pueden utilizar para infectar una célula blanco por medio de un virus ayudante con técnicas estándar. Los protocolos para producir los retrovirus recombinantes y para infectar las células *in vitro* o *in vivo* con dichos virus se encuentran en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F M. *et al.* (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y en otros manuales estándar de laboratorio.

Otro sistema de transferencia de genes virales útil en la presente invención utiliza los vectores derivados del adenovirus. El genoma de un adenovirus puede manipularse de manera tal que codifique y exprese el producto de interés de un gen pero está inactivado con respecto a su habilidad para duplicarse en un ciclo lítico normal de vida viral. Ver, por ejemplo, Berkner *et al.* (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld *et al.* (1991) *Science* 252:431-434; y Rosenfeld *et al.* (1992) *Cell* 68:143-155. Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa del adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (p. ej., Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son conocidos entre los entendidos en este campo. En ciertas circunstancias, los adenovirus recombinantes pueden tener sus ventajas ya que no son capaces de infectar

células que no están en estado de duplicación y se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluso células epiteliales (Rosenfeld *et al.* (1992) citado *supra*). Además, la partícula del virus es relativamente estable y dispuesta a purificación y concentración, y, como se indicó arriba, puede modificarse para afectar el espectro de factibilidad de infección. Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN foráneo contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula anfitriona pero se mantiene episomal y, por lo tanto, evita los problemas que pueden producirse como resultado de la mutagénesis insercional en situaciones donde el ADN introducido se integra en el genoma anfitrión (p. ej., ADN retroviral). Más aún, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para el ADN foráneo es, en comparación a otros vectores de transferencia de genes, relativamente grande (hasta 8 kilobases) (Berkner *et al.* citado *supra*; Haj-Ahmand and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267).

Otro sistema de vector viral útil para la transferencia de una secuencia nucleótida del sujeto codificando la proteína de fusión de EPO-ASh es el virus adenoasociado (VAA). El virus adenoasociado es un virus defectuoso que ocurre naturalmente y que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus ayudante para duplicarse eficientemente y tener un ciclo de vida productivo. (Para un resumen, ver Muzyczka *et al.* *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* (1992) 158:97-129). También es uno de esos pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no están en estado de duplicación, y exhibe una alta frecuencia de integración estable (ver por ejemplo Flotte *et al.* (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; y McLaughlin *et al.* (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). Se pueden empaquetar e integrar los vectores que contienen un mínimo de 300 pares base del VAA. El espacio para el ADN exógeno se limita a aproximadamente 4,5 kb. Un vector del VAA tal como el descrito en Tratschin *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 puede utilizarse para introducir el ADN en las células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células utilizando los vectores del VAA (ver por ejemplo Hermonat *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford *et al.* (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin *et al.* (1984) *J. Virol.* 51:611-619; y Flotte *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790).

Además de los métodos de transferencia viral como los ilustrados anteriormente, también pueden emplearse métodos no virales para causar la expresión de una proteína de fusión de EPO-ASh en el tejido de un animal no humano. La mayoría de los métodos no virales de transferencia de genes dependen de los mecanismos normales utilizados por las células mamíferas para la captación y transporte intracelular de las macromoléculas. En realizaciones preferidas, los sistemas de transferencia de genes no virales de la presente invención dependen de las vías endocíticas para la captación de la molécula nucleótida en cuestión por la célula blanco. Sistemas ejemplares de transferencia de genes de este tipo incluyen los sistemas derivados de liposomas, conjugados de la polilisina y envolturas virales artificiales.

En una realización representativa, una molécula de ácido nucleico codificando la proteína de fusión de EPO-ASh puede ser atrapada en liposoma con cargas positivas en la superficie, p. ej., lipofectinas y, optativo, que estén etiquetadas con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido blanco (Mizuno *et al.* (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-551; publicación PCT W091/06309; solicitud de patente japonesa 1047381; y publicación de patente europea EP-A-43075).

Los sistemas de transferencia de genes codificando la proteína de fusión de EPO-ASh pueden introducirse en un paciente mediante uno de varios métodos. Por ejemplo, una preparación farmacéutica del sistema de transferencia de genes puede introducirse sistemáticamente, p. ej., vía inyección intravenosa y la transducción específica de la proteína en las células blanco se produce predominantemente de la especificidad de transfección provista por el medio de transferencia del gen, expresión del tipo de célula o del tejido debido a las secuencias regulatorias transcripcionales que controlan la expresión del gen receptor, o una combinación de las mismas. En otras realizaciones, la transferencia inicial del gen recombinante se encuentra más limitada siendo la introducción al animal totalmente localizada. Por ejemplo, el medio de transferencia del gen puede introducirse por medio de un catéter (ver la patente de EE.UU. N° 5,328,470) o por inyección estereotáctica (p. ej., Chen *et al.* (1994) *PNAS* 91: 3054-3057).

La preparación farmacéutica del constructo de la genoterapia puede consistir esencialmente en un sistema de transferencia de genes en un diluyente aceptable o puede estar compuesta de una matriz de liberación lenta a la cual se ha incorporado el medio de transferencia de genes. Donde las proteína de fusión puede producirse intacta de las células recombinantes, p. ej., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células que producen la proteína de fusión.

#### Otras realizaciones

##### Otros animales transgénicos no humanos

La proteína de fusión de EPOa-ASh puede expresarse de una variedad de animales transgénicos no humanos. Un protocolo para la producción de un cerdo transgénico se encuentra en White and Yannoutsos, *Current Topics in Complement Research: 64th Forum in Immunology*, pág. 88-94; Patente de EE.UU. N° 5,523,226; Patente de EE.UU. N° 5,573,933; solicitud PCT WO93/25071; y solicitud PCT WO95/04744. Un protocolo para la producción de un ratón transgénico se encuentra en la patente de EE.UU. N° 5,530,177. Un protocolo para la producción de una rata transgénica se encuentra en Bader and Ganten, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Supp. 3:S81-S87, 1996. Un protocolo para la producción de una vaca transgénica se encuentra en *Transgenic Animal Technology, A Handbook*, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc. Un protocolo para la producción de una oveja transgénica se encuentra en *Transgenic Animal Technology, A Handbook*, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc. Un

## ES 2 273 497 T3

protocolo para la producción de un conejo transgénico se encuentra en Hammer *et al.*, *Nature* 315:680-683, 1985 y Taylor and Fan, *Frontiers in Bioscience* 2:d298308,1997.

5 Las realizaciones de la invención se ilustran más aún con los siguientes ejemplos que no se deben considerar como únicos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

10

##### *Constructos de fusión de EPOa-ASh*

El ADNc codificando la eritropoyetina análoga humana utilizado en las fusiones de EPOa-ASh fue diseñado y creado para alterar los tres sitios con enlace N y un sitio con enlace O de glicosilación (residuos 24, 38, 83 y 126, respectivamente). Además, sin alterar los residuos de los aminoácidos restantes, el uso del codón se cambió utilizando una tabla de usos de codones de la proteína de la glándula mamaria para maximizar la expresión de la proteína en la leche de los animales transgénicos. La figura 1 presenta una representación esquemática de los constructos de la fusión. En el caso donde ASH es la mitad de la terminal N de la proteína de fusión, se dejó intacto el péptido de la señal ASH y se borró la señal análoga de la eritropoyetina humana. Cuando la eritropoyetina análoga humana es la parte de la terminal N de la fusión, su secuencia de la señal se dejó intacta y se borró la de la proteína ASH. También, en el primer caso, se quitó el codón de tope de la ASH tipo salvaje así como el del ADNc de la eritropoyetina análoga humana en el segundo constructo. Además, se colocó una proteína de enlace (Ser-Gly<sub>4</sub>)<sub>4</sub>, o articulación, entre los dos asociados de fusión para reducir a un mínimo cualquier restricción inhibitoria que la ASH pueda tener en la porción EPO de la molécula y su actividad subsiguiente.

25

Los constructos de fusión de ADNc se colocaron en los vectores apropiados para ser expresados en el cultivo tisular y en la glándula mamaria del ratón transgénico. Con la expresión de estos constructos transitoriamente en el cultivo tisular (células COS7), se puede examinar una cantidad importante de características de los productos de estas fusiones de ADNc, p. ej., (1) ¿Se producen y secretan las proteínas? (2) ¿Son las proteínas auténticas, reconocibles por sueros contra EPOa y ASH? (3) ¿Son estas proteínas bioactivas *in vitro* e *in vivo*?

30

#### Ejemplo 2

##### *Transfecciones de las células COS7 y análisis de mancha Western*

35

Las células COS7 fueron transfectadas transitoriamente con constructos ADNc de fusión en placas triplicadas o en una placa única sólo con el vector (ADNcp3). Veinticuatro horas después de la transfección, se reemplazaron los medios de cultivo con un medio de suero reducido (Optimem). Al cabo de cinco días, se cosecharon todos los medios de cultivo y se separaron de las células contaminadas por centrifugación. Las muestras del medio acondicionado se analizaron con SDS-PAGE e inmunoblotting (ver la figura 2).

40

Se analizaron los sobrenadantes de las células COS transfectadas con constructos HIP/ADNcp3 o ADcp3 solamente (simulación) por medio de inmunoblotting con un anticuerpo policlonal contra la albúmina sérica humana (a-ASH). Después del análisis con el anticuerpo de la ASH, se extrajo la mancha y se repitió el análisis con un anticuerpo monoclonal contra la eritropoyetina humana (EPOh $\alpha$ ). El gel se cargó de la siguiente manera: carril 1, 10 ng ASH estándar; carril 2, 10  $\mu$ l CM simulado; carriles 3 a 5, 10  $\mu$ l ASH-EPOh CM; carriles 6 a 8, 10  $\mu$ l EPOh-ASH CM.

45

Los resultados de los experimentos por mancha Western indican claramente que se produjo una proteína soluble y secretada. Ambas proteínas de fusión son del tamaño previsto adecuado (~89 kDa) La banda que se observa en los carriles de medio acondicionado en la mancha del anticuerpo ASH no representa a ASH (~66 kDa) sino a ASb, ya que este anticuerpo tiene una cierta reacción cruzada con el ASb que se encuentra en el medio de cultivo tisular utilizado. Más importante todavía, es la capacidad que tienen los dos anticuerpos para reconocer ambas proteínas de fusión. Esto sugiere que se ha logrado la traducción apropiada de los ARNm de todo el constructo de fusión, dejando intactos y accesibles los epítomos apropiados a los anticuerpos.

55

#### Ejemplo 3

##### *Bioactividad*

Se realizó un ELISA con el mismo anticuerpo a-ASH utilizado en el análisis de mancha Western anterior para determinar las concentraciones de las dos proteínas de fusión en el sobrenadante del cultivo tisular. En forma compatible con los resultados de mancha Western, la proteína de fusión de EPOa-enlace-ASH demostró estar compuesta de niveles aproximadamente 4 veces más altos que la proteína de fusión de EPOa-enlace-ASH (232 ng/ml contra 59 ng/ml, respectivamente). Estos niveles deben proporcionar suficiente producto para evaluar *in vitro* y, posiblemente, *in vivo* si la fracción EPOa de las proteínas de fusión es 20% del tamaño total de la molécula, 232 ng/ml representa aproximadamente 10 U/ml de la proteína de fusión de EPOh-ASH [(2,1 x 10<sup>5</sup> U/mg) 2,32 x 10<sup>-4</sup> mg/ml](0,2) = 9,7 U/ml]. La actividad *in vitro* de la EPOa se determinará utilizando las líneas de células sensibles a la EPO. En resumen, se incuban las células durante un período de 22 a 72 horas con cantidades crecientes de la proteína de fusión de EPOa-

60

65

## ES 2 273 497 T3

ASh recombinante y el crecimiento celular se determina por medio de la captación de timidina [<sup>3</sup>H] o por medio del ensayo MTT colorimétrico (Sigma).

La proteína de fusión de EPOa-ASh puede purificarse rápidamente hasta casi homogeneizarla utilizando cromatografía de intercambio de cationes que aprovecha las propiedades de fijación de la ASH. De ser necesario, las proteínas de fusión pueden concentrarse y se pueden evaluar en ratones. Se pueden inyectar ratones subcutáneamente con la proteína de fusión (posiblemente con un mínimo de 3 x 50 ng por ratón, EPOa total) y detectar la respuesta determinando los cambios en la cantidad de reticulocitos o niveles de hematocritos. Igual que en los ensayos *in vivo*, puede utilizarse una inyección intramuscular directa, de alta concentración (>100 µg), del ADN plasmídico con base ADNcp3 y monitoreo de cambios subsecuentes en los niveles de reticulocitos y hematocritos. La inyección de plásmido ha demostrado elevar considerablemente los niveles de hematocritos en ratones cuando se usa el ADNc EPOh del tipo salvaje expresado con el promotor del citomagalovirus (CMV).

### Ejemplo 4

*Generación de un constructo de la proteína de fusión de la albúmina sérica humana de la eritropoyetina análoga (EPOa-ASh)*

El ADNc codificante de la proteína de fusión de la EPOa-ASh se introdujo en el vector BC355 que contenía los elementos regulatorios del gen de beta caseína caprina, creando un transgén con la secuencia de la proteína de fusión de EPOa-ASh bajo el control de un promotor específico lácteo. Este constructo se utilizó para centrarse en la expresión de la proteína de fusión de EPOa-ASh en la glándula mamaria lactante de un mamífero transgénico no humano.

### Ejemplo 5

*Prueba y caracterización de los constructos de genes en ratones transgénicos*

Los constructos transgénicos se evalúan por lo general en un sistema modelo de ratones para determinar su habilidad para dirigir altos niveles de expresión y su capacidad para expresarse de manera específica en un tejido. Se generaron ratones transgénicos con la expresión de fusiones de EPOa-ASh concentrándose en la glándula mamaria.

Los ratones transgénicos se generaron mediante microinyección de constructos de ADN de codificación de proteína de fusión en embriones de ratón. El análisis Western de la leche de ratones transgénicos con proteína de fusión de EPOa-ASh se realizó utilizando anticuerpos anti-EPO o anti-ASh monoclonales para determinar qué animales expresaban la proteína de fusión de EPOa-ASh en la leche.

El nivel de la proteína de fusión de EPOa-ASh detectado varía de aproximadamente 0,2 mg/ml a 4 mg/ml.

### Ejemplo 6

*Bioactividad de EPOa-ASh en ratones transgénicos*

Se analizó la bioactividad de la proteína de fusión de EPOa-ASh determinando los cambios en los niveles de hematocritos de ratones transgénicos expresando la proteína de fusión de EPOa-ASh. Ver la Tabla 1. Se compararon los niveles de hematocritos de los ratones transgénicos (655-1-8, 655-1-16, 655-1-43) con los ratones de control (CD por ratón). Los niveles normales de hematocritos son de aproximadamente 50.

TABLA 1

*Ratones transgénicos expresando la proteína de fusión de EPOa-ASh*

Ratón	d. p. partum	Hematocrito	Estado (10/98)
655-1-8	17	90	Muere 7/98
655-1-16	16	86	Muere 8/98
655-1-43	17	93	Vive
CD 1	17	50	NC
CD 1	17	57	NC
CD 1	17	52	NC

Tal como se muestra en la Tabla I, la expresión de la proteína de fusión de EPOa-ASh en ratones transgénicos aumentó considerablemente los niveles de hematocritos en los ratones.

## ES 2 273 497 T3

Además, la Tabla II proporciona los niveles de hematocritos de la cría virgen de los ratones transgénicos fundadores y los niveles de hematocritos de los fundadores macho (678-1-11 y 678-1-23) para demostrar la expresión de EPOa-ASh y la bioactividad de EPOa-ASh en estos ratones.

5

TABLA II

*Niveles de hematocritos en crías vírgenes de ratones fundadores transgénicos expresando la proteína de fusión de EPOa-ASh*

10

Ratón	Fundador	Hematocrito	Estado (10/98)
655-2-160	56 (bajo)	50	Vive
655-2-165	57 (bajo)	91	Vive
655-2-147	23 (macho)	86	Vive
655-2-155	31 (n.d./bajo)	43	Vive
655-1-11	(macho)	83	Vive
655-1-23	(macho)	79	Vive

15

20

25

Los niveles de hematocritos de las crías proporcionan los niveles basales de expresión de la EPOa-ASh bajo el control de un promotor de la caseína. Tal como se muestra en la Tabla II, hasta los niveles bajos de expresión de la proteína de fusión de EPOa-ASh tienen un efecto *in vivo* significativo.

30 Ejemplo 7

### *Generación y caracterización de cabras transgénicas*

Las secciones resumidas abajo describen los pasos más importantes en la producción de cabras transgénicas.

35

#### *Especies y razas de cabras*

Cabras de origen suizo, p. ej., las razas Alpina, Saanen y Toggenburg, son las preferidas en la producción de cabras transgénicas.

40

#### *Superovulación de las cabras*

El tiempo de estro de las donantes se sincroniza en el Día 0 con implantes subcutáneos de 6 mg de norgestomet (Syncromate-B, CEVA Laboratories, Inc., Overland Park, KS). Se administra prostaglandina después de los primeros siete a nueve días para desactivar la síntesis endógena de la progesterona. A partir del Día 13 después de la inserción del implante, se administra por vía intramuscular un total de 18 mg de hormona estimulante del folículo (FSH - Schering Corp., Kenilworth, NJ) durante tres días con dos inyecciones diarias. El implante se quita el Día 14. Veinticuatro horas después de quitarse el implante los animales donantes se aparean varias veces con machos fértiles durante un período de dos días (Selgrath, *et al.*, Theriogenology, 1990. pág. 1195-1205).

50

#### *Recolección de embriones no humanos*

La cirugía para la recolección de embriones no humanos se realiza el segundo día después de la concepción (ó 72 horas después de quitarse el implante). Se retira la comida y agua de las hembras superovuladas 36 horas antes de la cirugía. Se les administra por vía intravenosa 0,8 mg por kilo de Diazepam (Valium®), seguido inmediatamente con 5,0 mg por kilo de Cetamina (Ketaset) por vía intravenosa. Durante la cirugía y por medio de un tubo endotraqueal se administra Halothane (2,5%) en 2 L por min. de oxígeno. El tracto reproductivo se extrae con una incisión por laparotomía media. Se cuentan los cuerpos lúteos, folículos intactos de más de 6 mm de diámetro y los quistes ováricos para evaluar los resultados de la superovulación y para predecir la cantidad de embriones que se debieran recolectar por medio de enjuague oviductal. Se coloca una cánula en el ostium del oviducto y se mantiene en posición con una ligadura temporal única de Prolene 3,0. Se coloca una aguja calibre 20 en el útero a aproximadamente 0,5 cm de la unión útero tubárica. Se introduce un enjuague de aproximadamente diez a veinte ml de solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) en el oviducto canulado y se cosecha en una placa de Petri. Este procedimiento se repite en el lado opuesto y luego el tracto reproductivo se coloca nuevamente en el abdomen. Antes de cerrar, se vierten de 10 a 20 ml de una solución salina de glicerol estéril en la cavidad abdominal para evitar adherencias. Se cierra la línea alba con suturas simples interrumpidas de Polidioxanona o Supramid 2,0 y se cierra la piel con clips estériles.

65

## ES 2 273 497 T3

Los óvulos de cabra fertilizados se recolectan de los enjuagues de PBS del oviducto en un estereomicroscopio y se lavan luego en un medio F12 de Ham (Sigma, St. Louis, MO) que contiene 10% de suero fetal bovino (SFB) adquirido en Sigma. En casos donde los pronúcleos son visibles, los embriones se microinyectaron inmediatamente. Si los pronúcleos no están visibles, los embriones se pueden colocar en el F12 de Ham con 10% de SFB durante un tiempo de cultivo corto a 37°C en una cámara de gas humedecido con un 5% de CO<sub>2</sub> en el aire hasta que los pronúcleos queden visibles (Selgrath, *et al.*, Theriogenology, 1990. pág. 1195-1205).

### *Procedimiento de microinyección*

Los embriones de cabra de una célula se colocan en una microgota de medio de cultivo debajo de aceite en un portaobjetivo cóncavo. Los óvulos fertilizados con dos pronúcleos visibles se inmovilizan en una micropipeta de retención pulida a llama en un microscopio vertical Zeiss con plataforma fija y elementos ópticos Normarski. Se inyecta un pronúcleo con el constructo de ADN de interés, p. ej., un vector BC355 que contiene el gen de la proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) conectado durante la operación a los elementos regulatorios del gen de la beta caseína caprina, en inyección tamponada (Tris-EDTA) utilizando una microaguja fina de vidrio (Selgrath, *et al.*, Theriogenology, 1990. pág. 1195-1205).

### *Desarrollo de embriones no humanos*

Después de la microinyección, los embriones no humanos sobrevivientes se colocan en un cultivo F12 de Ham con un SFB del 10% y se incuban en una cámara de gas humedecido con un 5% de CO<sub>2</sub> en el aire a 37°C hasta que los animales no humanos receptores estén preparados para la transferencia del embrión (Selgrath, *et al.*, Theriogenology, 1990. pág. 1195-1205).

### *Preparación de los receptores*

La sincronización del estro en animales no humanos receptores se induce con implantes de 6 mg de norgestomet (Syncomate-B) en la oreja. En el Día 13 después de la inserción del implante, se administra a los animales una inyección única no superovulatoria (400 I.U.) de gonadotropina sérica de hembras equinas preñadas (PMSG) obtenida de Sigma. Las hembras receptoras se aparean con machos vasectomizados para asegurar la sincronía del estro (Selgrath, *et al.*, Theriogenology, 1990. pág. 1195-1205).

### *Transferencia de embriones no humanos*

Todos los embriones no humanos de una hembra donante se mantienen juntos y se transfieren a un recipiente único cuando sea posible. El procedimiento quirúrgico es idéntico al descrito anteriormente para la recolección de embriones, excepto que no se canaliza el oviducto y los embriones no humanos se transfieren en un volumen mínimo de F12 de Ham con un 10% de SFB en el lumen oviductal por vía de la fimbria utilizando una micropipeta de vidrio. Los animales no humanos con más de seis a ocho puntos de ovulación en el ovario no se consideran receptores adecuados. El cierre de la incisión y el cuidado postoperatorio son los mismos que para animales donantes (ver, p. ej., Selgrath, *et al.*, Theriogenology, 1990. pág. 1195-1205).

### *Monitoreo de la preñez y parición*

La preñez se determina por ultrasonografía 45 días después del primer día del estro permanente. En el Día 110 se realiza un segundo examen de ultrasonido para confirmar la preñez y evaluar el estrés del feto. El Día 130 se vacuna a la hembra preñada con un toxoide de tétano y Clostridium C&D. Se administra Selenium y vitamina E (Bo-Se) IM e Ivermectin por vía SC. El Día 145 se mudan las hembras a un establo limpio y se las deja que se aclimaticen a ese entorno antes de inducir el parto alrededor del Día 147. La parición se induce el Día 147 con 40 mg de PGF<sub>2a</sub> (Lutalyse<sup>®</sup>, Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan). Esta inyección se administra por vía intramuscular en dos dosis, una dosis de 20 mg seguida de una dosis de 20 mg cuatro horas más tarde. La hembra está bajo observación periódica durante el día y la noche después de la primera inyección de Lutalyse<sup>®</sup> del Día 147.

Se aumentan las observaciones a cada 30 minutos comenzando en la mañana del segundo día. La parición se produjo entre las 30 y 40 horas después de la primera inyección. Después de la parición, se ordeña la hembra para recolectar el calostro y se confirma la salida de la placenta.

### *Verificación de la naturaleza transgénica del animal F<sub>0</sub>*

Para la evaluación de animales F<sub>0</sub> transgénicos, se aísla el ADN genómico de dos líneas de células diferentes para evitar pasar por alto los "transgénicos en mosaico". Un animal mosaico se define como cualquier cabra que no tiene por lo menos una copia del transgén por lo menos en cada célula. Por lo tanto, se toma una muestra tisular de oreja (mesodermo) y una muestra de sangre de un animal F<sub>0</sub> de dos días para aislar el ADN genómico Lacy, *et al.*, A Laboratory Manual, 1986, Cold Springs Harbor, NY; and Herrmann and Frischaut, Methods Enzymology, 1987. 152: pág. 180-183). Se analizan las muestras de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Gould, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1989. 86: pág. 1934-1938) utilizando cebadores específicos para el gen de la proteína de fusión de EPOa-ASh humana y mediante análisis de mancha Southern (Thomas, Proc Natl. Acad. Sci., 1980. 77:5201-5205) utilizando una EPO de cebado aleatorio o una sonda de ADNc de ASH (Feinberg and Vogelstein, Anal. Bioc., 1983.

## ES 2 273 497 T3

132: pág. 6-13). La sensibilidad del ensayo se estima como la detección de una copia del transgén en 10% de las células somáticas.

### *Generación y selección del rebaño de producción*

5

Los procedimientos descritos anteriormente pueden utilizarse para la producción de cabras fundadoras ( $F_0$ ) transgénicas, así como otras cabras transgénicas. Las cabras fundadoras  $F_0$  transgénicas, por ejemplo, se aparean para producir leche, si son hembras, o para producir crías hembras transgénicas si es un fundador macho. Este fundador macho transgénico puede aparearse con hembras no transgénicas, para producir crías hembra transgénicas.

10

### *Transmisión de un transgén y características pertinentes*

La transmisión del transgén de interés, se analiza en la línea caprina en el tejido y sangre de la oreja por medio de RCP y de mancha Southern. Por ejemplo, el análisis de mancha Southern del fundador macho y de las tres crías transgénicas no muestra ninguna redistribución o cambio en la cantidad de copias entre generaciones. Las manchas Southern se analizan con la sonda de ADNc de la proteína de fusión de EPOa-ASh. Las manchas se analizan en un Betascope 603 y la cantidad de copias se determina comparando el transgén con el gen endógeno de la caseína beta caprina.

15

### *Evaluación de los niveles de expresión*

20

El nivel de expresión de la proteína transgénica en la leche de animales transgénicos se determina por medio de ensayos enzimáticos o manchas Western.

25

Existen otras realizaciones en las siguientes reivindicaciones.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) donde por lo menos el residuo de un aminoácido de la mitad de eritropoyetina análoga (EPOa) de la proteína de fusión se altera de manera tal que un sitio que actúa como sitio de glicosilación en la eritropoyetina (EPO) humana tipo salvaje no sirve como sitio de glicosilación de la EPOa, siendo dicho residuo del aminoácido la EPOa equivalente a un residuo de la EPO seleccionado del grupo compuesto por residuos de aminoácidos Asn<sub>24</sub>, Asn<sub>38</sub>, Asn<sub>83</sub> y Ser<sub>126</sub>.

10 2. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde dicha proteína de fusión tiene la fórmula:



15 Donde R1 es una secuencia de aminoácido de la eritropoyetina análoga; L es un enlace peptídico y R2 es una secuencia de aminoácido de la albúmina sérica humana.

3. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde se ha eliminado dicho residuo de aminoácido.

20 4. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde se ha reemplazado el residuo de dicho aminoácido con el residuo de un aminoácido que no actúa como sitio de glicosilación.

25 5. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde dicho sitio de glicosilación se ha alterado en la EPOa equivalente del residuo del aminoácido de la EPO tipo salvaje Ser<sub>126</sub> y se ha alterado por lo menos otro sitio de glicosilación con enlace N seleccionado del grupo compuesto de la EPOa equivalente del residuo del aminoácido de la EPO tipo salvaje Asn<sub>24</sub>, Asn<sub>38</sub> y Asn<sub>83</sub>.

6. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde dicho sitio de glicosilación permite la glicosilación con enlace N y se altera reemplazando el residuo de un aminoácido Asn con Gln.

30 7. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde dicho sitio de glicosilación permite la glicosilación con enlace O y se altera reemplazando el residuo de un aminoácido Ser con Gln.

35 8. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde se ha alterado una o más EPOa equivalentes de los residuos de aminoácidos de la EPO tipo salvaje 24, 38 u 83.

9. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 8, donde se ha reemplazado con Gln una o más EPOa equivalente de los residuos de aminoácidos de la EPO tipo salvaje 24, 38 u 83.

40 10. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde se ha alterado la EPOa equivalente del residuo del aminoácido de la EPO tipo salvaje 126.

11. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 10, donde se ha reemplazado con Ala la EPOa equivalente del residuo del aminoácido de la EPO tipo salvaje 126.

45 12. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde se ha alterado cada una de las EPOa equivalentes de los residuos de aminoácidos de la EPO tipo salvaje 24, 38, 83 y 126 de manera tal que no sirva como sitio de glicosilación.

50 13. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 12, donde se ha reemplazado cada una de las EPOa equivalentes de los residuos de aminoácidos de la EPO tipo salvaje con Gln, Gln, Gln y Ala respectivamente.

14. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 2, donde dicho enlace peptídico tiene una longitud de 10 a 30 aminoácidos.

55 15. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 14, donde cada uno de dichos aminoácidos en dicho enlace peptídico se selecciona del grupo compuesto de Gly, Ser, Asn, Thr y Ala.

60 16. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 2, donde dicho enlace peptídico incluye una secuencia con la fórmula (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly) donde y es menor o igual a 8.

17. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 2, donde dicho enlace peptídico incluye una secuencia con la fórmula (Ser-Ser-Ser-Ser-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro).

65 18. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión incluye de izquierda a derecha una EPOa, donde la proteína de fusión incluye de izquierda a derecha una EPOa que incluye los residuos de aminoácidos Gln<sub>24</sub>, Gln<sub>38</sub>, Gln<sub>83</sub> y Ala<sub>126</sub> en lugar de los residuos de aminoácidos de la EPO tipo salvaje Asn<sub>24</sub>, Asn<sub>38</sub>, Asn<sub>83</sub> y Ser<sub>126</sub>, un enlace peptídico y albúmina sérica humana.

## ES 2 273 497 T3

19. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión es de izquierda a derecha EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y albúmina sérica humana.

5 20. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión de EPOa-ASh incluye, de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico, y una EPOa que incluye los residuos de los aminoácidos Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126 en lugar de los residuos de aminoácidos de la EPO tipo salvaje Asn24, Asn38, Asn83 y Ser 126.

10 21. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1,18 ó 20, donde la EPOa es EPO Gln24, Gln38, Gln83, Ala126.

15 22. La proteína de fusión de EPOa-ASh de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión es de izquierda a derecha, albúmina sérica humana, un enlace peptídico con la fórmula ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)<sub>3</sub>-Ser-Pro) y EPO Gln24, Gln38, Gln83 y Ala126.

23. Un ácido nucleico aislado compuesto de una secuencia nucleótida que codifica una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh), donde por lo menos el residuo de un aminoácido de la EPO-ASh codificada que puede actuar como sitio de glicosilación en la EPO se altera de manera tal que no actúa como sitio de glicosilación en la EPOa, dicho residuo de aminoácido siendo la EPOa equivalente de un residuo de la EPO de tipo salvaje seleccionado de un grupo compuesto por residuos de aminoácidos Asn<sub>24</sub>, Asn<sub>38</sub>, Asn<sub>83</sub>, y Ser<sub>126</sub>.

24. Un vector de expresión o un constructo compuesto del ácido nucleico de la reivindicación 23.

25 25. Una célula aislada compuesta del vector o constructo de la reivindicación 24.

26. Un método para la producción de proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1 en un constructor o vector, que incluye la formación en un constructo o vector de una secuencia en la cual un ácido nucleico compuesto de una secuencia nucleótida que codifica una EPOa está vinculado en estructura a un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótida que codifica una albúmina sérica humana.

27. Un método para la producción de una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1 que incluye:

35 provisión de una célula aislada que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh y

40 expresión de dicha proteína de fusión de EPOa-ASh de dicho ácido nucleico, produciendo así dicha proteína de fusión de EPOa-ASh.

28. El método de la reivindicación 27, donde dicha célula aislada se selecciona de un grupo compuesto de una célula de mamífero, levadura, planta, insecto o bacteria.

45 29. Un método para la producción de proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1 que incluye:

50 proporcionar un organismo transgénico no humano que incluye un transgén que dirige la expresión de la proteína de fusión de EPOa-ASh;

permitir la expresión del transgén; y

recuperar la proteína de fusión de EPOa-ASh.

55 30. Un método que proporciona una preparación transgénica que incluye una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1 en la leche de un mamífero transgénico no humano que incluye:

60 proporcionar un mamífero transgénico no humano con una secuencia de codificación de una proteína de fusión de EPOa-ASh conectada durante la operación a una secuencia promotora cuyo resultado es la expresión de la secuencia de codificación de la proteína en las células epiteliales de una glándula mamaria.

65 permitir la expresión de la proteína de fusión y obtiene leche del mamífero, por lo tanto, proporcionando la preparación transgénica.

31. El método de la reivindicación 29 ó 30, donde el organismo transgénico no humano es un animal transgénico no humano.

## ES 2 273 497 T3

32. El método de la reivindicación 29 ó 30, donde el organismo transgénico no humano es un mamífero lechero transgénico.

5 33. El método de la reivindicación 29 ó 30, donde la proteína de fusión de EPOa-ASh se produce en una glándula mamaria de un mamífero transgénico no humano bajo el control de un promotor específico de la leche.

34. El método de la reivindicación 29 ó 30, donde dicho promotor es el promotor de la proteína o caseína sérica de la leche.

10 35. El método de la reivindicación 34, donde el mamífero transgénico no humano es una cabra o una vaca.

36. Un organismo transgénico no humano, que incluye un transgén que codifica una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de la eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1.

15 37. Un conejo transgénico, que incluye un transgén que codifica una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1.

20 38. Un ave, que incluye un transgén que codifica una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1.

39. Una composición farmacéutica con una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1.

25 40. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que sufre de insuficiencia renal, enfermedad crónica, infección por el VIH, pérdida de sangre o cáncer.

30 41. Uso de una cantidad profiláctica de una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto preoperativo.

35 42. Un método para la producción de una proteína de fusión de la albúmina sérica humana de eritropoyetina análoga (EPOa-ASh) de acuerdo con la reivindicación 1 en una célula cultivada que incluye el suministro de una célula cultivada que incluye un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de EPOa-ASh, y expresando la proteína de fusión de EPOa-ASh del ácido nucleico, produciendo así la proteína de fusión de EPOa-ASh.

40

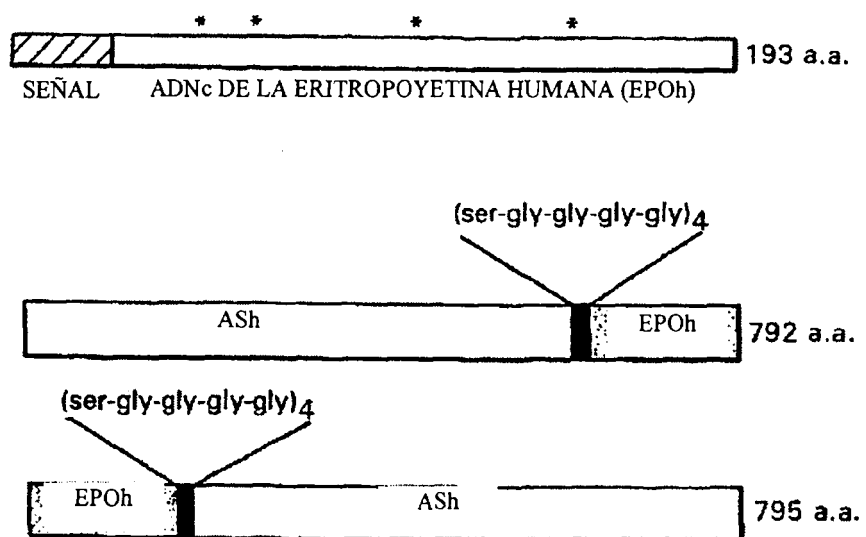
45

50

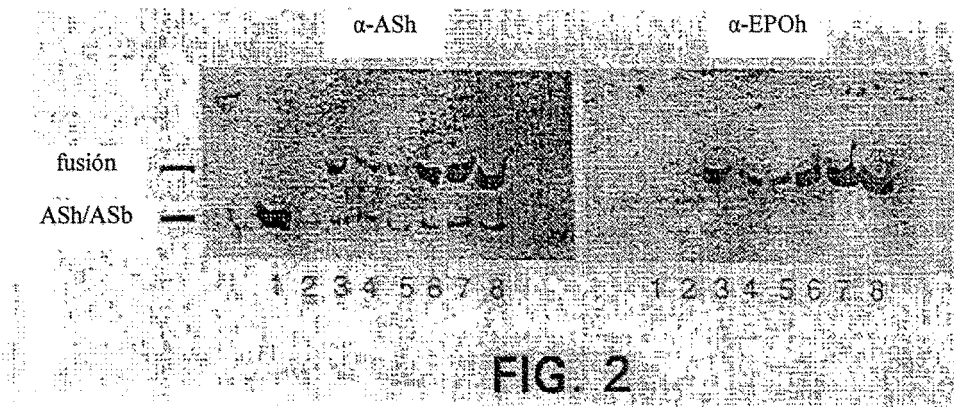
55

60

65



**FIG. 1**



# ES 2 273 497 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Genzyme Transgenics Corp.
- 5 <120> “*PROTEÍNA DE FUSIÓN DE LA ALBÚMINA SÉRICA HUMANA DE ERITROPOYETINA ANÁLOGA*”  
<130> 10275/041WO1  
<140> PCT/US99/13438  
<141> 1998-06-15
- 10 <150> US 60/089,343  
<151> 1998-06-15  
<160> 4
- 15 <170> FastSEQ for Windows, Versión 4. 0  
<210> 1  
<211> 40  
<212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Secuencia de enlace generada sintéticamente; los subconjuntos 2 a 8 (cada uno compuesto de una repetición de los primeros cinco aminoácidos) que comprenden las posiciones 6 a 40 pueden estar ausentes o presentes
- 25 <400> 1
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     |     |     |
- 35 <210> 2  
<211> 11  
<212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Secuencia de enlace generada sintéticamente  
<400> 2
- 45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10
- 50 <210> 3  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
<223> Secuencia de enlace generada sintéticamente  
<400> 3
- 60 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10 15  
Gly Gly Gly Gly  
20
- 65 <210> 4  
<211> 17

# ES 2 273 497 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de enlace generada sintéticamente

<400> 4

10 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser  
1 5 10 15  
Pro

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65