

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
4 de Octubre de 2007 (04.10.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/110001 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2007/000012

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de Marzo de 2007 (29.03.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2006-0073 29 de Marzo de 2006 (29.03.2006) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA** [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán,, Playa, 10600 Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **PAEZ MEIRELES, Rolando** [CU/CU]; Calle 186 Edificio 3115 Apto. 13B entre 31 y 33, Playa, 10600 Ciudad de La Habana (CU). **CHINEA SANTIAGO, Glay** [CU/CU]; Calle 186 No. 3115 entre 31 y 33 Apto. 4C, Playa, 10600 Ciudad de La Habana (CU). **GONZALEZ ROCHE, Diamile** [CU/CU]; Calle 186 No. 3115 Apto 11B entre 31 y 33, Playa, 10600 Ciudad de La Habana (CU). **GAVILONDO COWLEY, Jorge, Víctor** [CU/CU]; Calle G No. 460 entre 19 y 21 Apto. 11, Vedado, Plaza, 10600 Ciudad de La Habana (CU). **BELLO RIVERO, Iraldo** [CU/CU]; Calle 184 No. 3112, apto.30, entre 31 y 33, Playa, 10600 Ciudad de La Habana (CU). **MARTÍNEZ NUÑEZ, Anazuria** [CU/CU]; Calle 184 No 3112 apto 15 entre 31 y 33 Cubanacán Playa, 10600 Ciudad de La Habana (CU).

(74) Mandatario: **SELMAN-HOUSEIN SOSA, Manuel**; Calle 184 No. 3112 entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, 10600 Ciudad de La Habana (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: CHIMERIC MOLECULES FUSED TO MATRILIN-1, FOR THERAPEUTIC USE

(54) Título: MOLÉCULAS QUIMÉRICAS FUSIONADAS A MATRILINA 1, DE USO TERAPÉUTICO.

(57) Abstract: Chimeric molecules fused to the corresponding peptide at the carboxyl end of human matrilin-1 by means of a flexible spacer that confers on them a longer blood half-life and superior specific activity as compared with non-fused molecules.

(57) Resumen: Moléculas quiméricas fusionadas al péptido correspondiente al extremo carboxilo de la Matrilina 1 humana mediante un espaciador flexible que les confiere un mayor tiempo de vida media en sangre y una actividad específica superior respecto a las moléculas no fusionadas.



WO 2007/110001 A2

MOLÉCULAS QUIMÉRICAS FUSIONADAS A MATRILINA 1, DE USO TERAPÉUTICO.

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología, con las ciencias biológicas y la industria farmacéutica, y en particular con las modificaciones de moléculas para mejorar su farmacocinética, aumentando su tiempo de vida medio en sangre y la actividad biológica.

Arte Previo

El uso de proteínas y péptidos para uso terapéuticos en humanos ha aumentado en los últimos años debido fundamentalmente a: (1) descubrimiento de nuevas moléculas de proteínas y péptidos, (2) mejor entendimiento de los mecanismos de acción *in vivo*, (3) mejoramiento en los sistemas de expresión de las proteínas y síntesis de los péptidos y (4) mejoramiento en la formulaciones o en las tecnologías de modificación de moléculas que permiten mejorar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas.

Se han desarrollado un gran número de sistemas que alteran la liberación de fármacos inyectables con la intención de mejorar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de agentes terapéuticos. Nuevos sistemas de liberación de fármacos pueden ser producidos a través de un cambio en formulación (e.j. productos de liberación continua o liposomas) o a través de una adición a la molécula del fármaco ("PEGilación").

Posibles ventajas de los nuevos mecanismos de liberación incluyen duración de actividad farmacológica aumentada o prolongada, una disminución en efectos adversos, y un incremento en el cumplimiento de pacientes y calidad de vida. Sistemas de liberación continua inyectables liberan fármacos de manera controlada y predeterminada, y son apropiados especialmente para fármacos donde es importante evitar grandes fluctuaciones en las concentraciones en plasma. El encapsular un fármaco dentro de un liposoma puede producir una vida media prolongada y un cambio en distribución hacia tejidos con permeabilidad capilar aumentada (ej. tumores, tejido infectado). La PEGilación provee un método para la modificación de proteínas terapéuticas con el propósito de minimizar muchas de las limitaciones que están asociadas con estos agentes (ej. estabilidad pobre, vida media corta, inmunogenicidad) (Reddy, K.R., 2000. Controlled-release, pegylation,

liposomal formulations: New mechanisms in the delivery of injectable drugs. *Ann. Pharmacother.* 34: 915–923).

La liberación sistémica de moléculas empleando microesferas biodegradables ha sido ampliamente estudiada por las siguientes ventajas: (1) protección a proteínas sensibles a degradación y (2) liberación prolongada o modificada (Sinha, V. R. and Trehan, A., 2003. Biodegradable microspheres as protein delivery, *J. Controlled Release*, 90(3): 261-280,).

Existen reportes de un gran número de proteínas en los cuales se han aplicado las diferentes tecnologías de liberación modificada, entre las que se encuentra en primer lugar la Eritropoyetina humana (EPOh) recombinante.

La EPOh es una glicoproteína de 165 aminoácidos (Mikaye, T. *et al.* Purification of Human Erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558- 5564, 1977). Su peso molecular estimado utilizando gel de poliacrilamida-dodecyl sulfato sódico oscila entre 27.000 y 39.000 daltons (Mikaye, T. *et al.*, Purification of Human Erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558- 5564, 1977).

En investigaciones se ha comprobado que al retirar el estímulo hipóxico, el ARNm de EPO disminuye rápidamente en la sangre, pudiendo ser indetectable a las 3 horas, lo que indica que su tiempo de vida media es corto (Lacombe, C. *et al.* 1988. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* 81:620–623; Koury, S.T. *et al.* 1989. Quantitation of erythropoietin producing cells in kidneys of mice by in situ hybridation: Correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA and serum erythropoietin concentration. *Blood* 74: 645-651). Se estimó que el tiempo de vida media en plasma sanguíneo de la EPO oscila entre 4 y 13 horas, este tiempo es muy bajo si es comparado con el de otras moléculas usadas terapéuticamente, esto hace que un paciente que requiera del empleo de la hormona de forma regular deba inyectarse con frecuencia para mantener los niveles de eritrocitos cercanos a los normales (Spivak, J.L. 1992. The mechanism of action of erythropoietin: Erythroid cell response. En: J.W. Fisher (Ed.) *Biochemical Pharmacology of Blood and Blood-Forming Organs*. Springer-Verlag Berlin. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 101: 49-114; Jelkmann, W. 1986. Renal Erythropoietin: Properties and Production. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 104: 139-205, 1986).

Con el objetivo de aumentar el tiempo de vida medio de la Epohr se han realizado mutaciones a la molécula para aumentar los sitios de N-glicosilación (Burke, Paul.,

2003. Device for the sustained release of aggregation-stabilized, biologically active agent. U.S Patent No. 20030133979), se ha encapsulado en microesferas (Morlock M, *et al.* 1998. Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and in-vitro release
5 properties. J Control Release. 4;56(1-3):105-15) y liposomas (Moriya H, *et al.* 1997. Pharmacokinetic and pharmacological profiles of free and liposomal recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administrations in rats. Maitani Y, Shimoda N, Takayama K, Nagai T. Pharm Res. 14(11):1621-8, se ha conjugado químicamente con polímeros (Jolling K. *et al.* 2005.
10 Mixed-effects Modelling of the Interspecies Pharmacokinetic Scaling of Pegylated Human Erythropoietin. Eur J Pharm Sci; 24: 465-475). Además se ha reportado la obtención de un dímero de Epohr con vistas a aumentar la actividad biológica de la misma (Bruno D., *et al.* 2001. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. Blood, Vol. 97, No. 12, 3776-3782)

15 Otras de las moléculas a las cuales se le han aplicado diferentes tecnologías de liberación modificada es el Interferón alfa 2b rec. Esta proteína recombinante ha sido usada con gran éxito en el tratamiento de la Hepatitis C. Sin embargo una limitación del tratamiento de la Hepatitis C con IFN (es que tiene un tiempo de vida media de 7 a 9 horas y es prácticamente indetectable en sangre al cabo de las 24
20 horas de administrado. Las fluctuaciones resultantes de IFN (exógeno durante el curso del tratamiento se considera que impactan negativamente en la eficiencia antiviral del tratamiento. Una terapia antiviral que mantenga suprimida la carga viral puede disminuir más eficientemente la velocidad de replicación viral y así reducir el riesgo de mutaciones virales y resistencia a drogas (Palumbi, S. R., 2001. Humans
25 as the World's Greatest Evolutionary Force. Science 293: 1786-1790)

Con el objetivo de resolver los problemas mencionados anteriormente se ha desarrollado el IFN-Peg y en microesferas (Reddy, K.R., 2000. Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: New mechanisms in the delivery of injectable drugs. Ann. Pharmacother. 34: 915-923; Diwan M, Park TG. 2003. Stabilization of
30 recombinant interferon-alpha by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres. Int J Pharm; 252:111-122).

Se han reportado otras moléculas que empleas estos sistemas como por ejemplo: GSCF, EGF, HGH etc.

El uso de las modificación de las moléculas que se describen en esta invención permiten aumentar el tiempo de vida medio y la actividad biológica, así como evitar problemas reportados para los sistemas descritos anteriormente como por ejemplo: Inmunogenicidad y reducción de la actividad específica.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El objeto de esta invención es la obtención de biomoléculas quiméricas con características superiores en cuanto al tiempo de vida medio y actividad biológica respecto a la proteína no quimérica. Las proteínas de interés terapéutico se unen
10 con este objetivo al extremo carboxilo de la proteína de matriz de cartílago humano Matrilina 1, fusión mediada por un espaciador flexible de tamaño variable.

En esta invención se describe la obtención de varias biomoléculas mediante la fusión a cada una de un espaciador aminoacídico flexible, y a continuación del mismo los 45 aminoácidos correspondientes al extremo carboxilo de la proteína de
15 matriz de cartílago humano Matrilina 1 (Fig. 1, 2). Con el empleo del extremo Carboxilo de la Matrilina 1 se logra que la biomolécula base se asocie en forma de trímeros posibilitando el aumento de su tamaño molecular, lo que conduce a un incremento del tiempo de vida medio en sangre del producto farmacéutico. La proteína quimérica resultante está formada por cuatro dominios globulares (tres
20 correspondientes a la molécula base y uno correspondiente al trímero helicoidal del fragmento de Matrilina 1. Estos cuatro dominios se encuentran unidos por segmentos espaciadores ricos en Gly y Ser, lo que permite gran flexibilidad entre los dominios globulares. El diseño estructural de la molécula quimérica resultante implica que el radio de giro efectivo sea superior al de una proteína globular de la
25 misma talla del trímero. Además, la selección adecuada de la talla del espaciador flexible posibilita que esta biomolécula pueda interactuar a la misma vez con más de una copia de su receptor, lo cual posibilita un aumento en la actividad biológica del producto, por concepto de mayor avidez e incremento de la señalización por formación de clusters de receptores activados en la membrana de la célula.
30 Teniendo en cuenta el origen humano de la proteína Matrilina 1 (MATN1) se descarta posibilidad alguna de inmunogenicidad del producto farmacéutico.

Las biomoléculas fusionadas de la forma descrita en esta invención tienen como ventajas: (1) Mayor tiempo de vida medio en sangre, (2) Mayor actividad biológica,

(3) No existen problemas de inmunogenicidad y (3) No se afecta la actividad específica de la molécula base.

La presente invención comprende el empleo de cualquier biomolécula de naturaleza aminoacídica, como proteínas (Eritropoyetina, GSCF, EGF, IFN, etc.), anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos monoclonales, péptidos fusionados a un determinado espaciador flexible seguido del extremo Carboxilo de la Matrilina 1.

También la presente invención comprende el empleo de cualquier tipo de espaciador flexible que permita la accesibilidad de esta biomolécula a su respectivo receptor.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:

Figura 1: Representación esquemática de la biomolécula de fusión BIOMOLECULA-MATN1

Figura 2: Esquema de los dominios de multimerización

Figura 3: Mapa de restricción del gen rHuEPO

Figura 4: Estrategia general de construcción del plásmido o vector de expresión pKGEPO1

Figura 5: Mapa del vector de expresión de Eritropoyetina humana en células eucarióticas pKGEPO1

Figura 6: Esquema de los genes sintéticos *MATN1s1*, *MATN1s2*, *MATN1s3* y *MATN1s4* diseñados para fusionar al extremo 3' del gen *rHuEPO*.

Figura 7: Vectores pZMATN1, 2, 3 y 4

Figura 8: Vectores pEPOMATN1,1, pEPOMATN1,2, pEPOMATN1, 3, pEPOMATN1,4

Figura 9: *Western Blotting* realizado a muestras provenientes de los sobrenadantes de cultivo del clon de CHO productor de EPO-MATN1,1.

Carril 1: Células CHO sin transfectar (Cntrl -),

Carril 2: Clon de la línea de CHO transfectada con pKGEPO1 (Cntrl +) y seleccionada con MTX;

Carriles 3 y 4: Clones 6 y 8 de CHO transfectados con el plásmido pEPOMATN1,1y seleccionada con MTX y Carril 5: patrón de masas moleculares transferible (PMM).

Figura 10: Electroforesis SDS-PAGE de la muestra de EPO-MATN1,1 del proceso purificación. 1- Patrón de Pesos moleculares, 2- Muestra de cultivo celular 3- G-25

elución, 4- Fracción no absorbida, 5- Lavado con 20 mM Imidazol, 6- elución con 50 mM Imidazol, 7- elución con 100 mM Imidazol, 8- Muestra control de Epo hu-r.

Figura 11: Estudio mediante Filtración en gel- HPLC de la EPO-MATN1,1 obtenida mediante el procedimiento descrito y comparada con la Epo hu-r .

5 **Figura 12:** Se presenta un esquema de los elementos principales del vector pJGm-25 empleado para la expresión del scFv anti-CEA en *E. coli*. pLac es el promotor lactosa, SP es el péptido señal pel B, ApaI y NotI son sitios de restricción entre los cuales está clonado el scFv anti-CEA, c-myc es el dominio cuya codificación es reconocida por el anticuerpo monoclonal 9E10, 6-his es un dominio que codifica
10 para 6 histidinas con vistas a la purificación de la proteína resultante mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos, Term es el terminador de la transcripción y Amp^r es el gen de resistencia a la ampicilina.

Figura 13: Secuencia y esquema representativo de la composición por partes del gen sintético para digerir y fusionar al extremo 3'del scFv anti -CEA en el plasmidio
15 pJGm-25. Se presenta un esquema de la banda sintética que incluye, de izquierda a derecha: bases adicionales anteriores al sitio de restricción *Not I* en el extremo 5' (en verde), sitio *Not I* (subrayado), base T adicional para corrección del marco de lectura (en rojo), 33 bases correspondientes al segmento de unión o linker (en azul), 126 bases correspondientes al segmento de gen de la Matrilina 1 (en amarillo), sitio
20 *Not I* (subrayado), bases adicionales posteriores al sitio de restricción *Not I* en el extremo 3' (en verde).

Figura 14: Esquema representativo de la composición por partes de la proteína quimérica de fusión scFv-sMATN1: scFv anti-CEA (blanco), linker (azul claro), sMATN1 (amarillo), c-myc (negro), 6 histidinas (azul oscuro).

25

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

EJEMPLO 1. Obtención y caracterización de la proteína EPO-MATN1.

Construcción del plasmidio pEPOMATN1 para integración final del gen EPOMATN1 al genoma de Células de Ovario de Hamster Chino (CHO) y expresión en las
30 mismas de la proteína de fusión Eritropoyetina-Fragmento del extremo carboxilo de la proteína Matrilina 1 humana (EPO-MATN1)

Para obtener los genes recombinantes que codifiquen para las proteínas de fusión Eritropoyetina-Fragmento del extremo carboxilo de la proteína Matrilina 1 humana 1

(SEC ID No.1), Eritropoyetina-Fragmento del extremo carboxilo de la proteína Matrilina 1 humana 2 (SEC ID No.10), Eritropoyetina-Fragmento del extremo carboxilo de la proteína Matrilina 1 humana 3 (SEC ID No.11) y Eritropoyetina-Fragmento del extremo carboxilo de la proteína Matrilina 1 humana 4 (SEC ID No.12) se realizó primeramente el aislamiento y clonaje del ADN complementario codificante para la eritropoyetina humana, para lo cual se obtuvo ARN total a partir de tejido renal fresco mediante extracción con fenol ácido- isotiocianato de guanidío. El ARN poliadenilado obtenido fue seleccionado mediante cromatografía de afinidad en gel de oligo dT celulosa. Cinco microgramos del ARN mensajero obtenido por esta vía fueron usados para sintetizar ADN complementario (ADNc), una alícuota del cual fue usada para la amplificación del ADNc codificante para la EPO humana mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Randall, K. et al., Science, 42394, 487-491, 1988). Para esta amplificación se usaron como cebadores dos oligonucleótidos: EPO-P1 (SEC ID No.2) y EPO-P2 (SEC ID No.3), diseñados para ambos flancos de la región codificante deducida a partir de la secuencia reportada del ARNm.

El producto de PCR fue digerido con *EcoR* I y *Hind* III y subclonado en los vectores de fagos filamentosos M13mp18 y M13mp19. La secuencia correcta fue verificada mediante secuenciación de ambas cadenas de los insertos de ADN por el método de los dideoxinucleósidos trifosfatos (Sanger, S. et al., 1977. DNA sequencing with chainterminating inhibitors," Proc. Nat. Acad. Sci. 74, pp. 5463–5467), utilizando el kit de secuencia SequenaseTM versión 2.0 de Amersham Int, (UK) y los oligonucleótidos cebadores universales descritos para estos vectores. La secuencia del producto de PCR coincidió con la descrita para el ADNc codificante para la EPO humana (SEC ID No.4). El mapa del gen *rHuEPO* obtenido por esta vía se muestra en la Figura 1.

El ADNc verificado por secuencia nucleotídica fue subclonado en el vector de expresión eucariótico pKG5 bajo el control del promotor temprano del virus SV40. En la Figura 2 se muestra la estrategia general de construcción del plásmido o vector de expresión pKGEPO1, este vector contiene, además del gen codificante para la eritropoyetina humana recombinante (*rHuEPO*), los siguientes elementos regulatorios: Una unidad de transcripción para selección en células eucarióticas compuesta por el gen de resistencia a G418 (neo) bajo el control del promotor Timidina quinasa (tk); un gen de resistencia a la ampicillina (*Amp^r*) para selección en

Escherichia coli; un origen de replicación derivado de pBR322 para su propagación en *Escherichia coli*; la Región enhancer C_μ y la región SV40 poliA (Figura 3).

A partir de la construcción genética pKGEPO1 se proyectó un vector recombinante para el gen quimérico *rHuEPO* -*MATN1* que se emplearía para la obtención posterior de partículas virales infectivas. Para el diseño del fragmento de DNA a fusionar al extremo 3' del gen *rHuEPO*, se tuvo en cuenta el esquema de una proteína quimérica esbozado, en cuyo extremo amino terminal se encuentra la proteína EPOh, a continuación de la misma un espaciador flexible (de 11, 15, 16 o 20 aminoácidos y finalmente los 45 aminoácidos correspondientes al extremo carboxilo de la proteína de matriz de cartílago humano Matrilina 1.

Los genes de fusión, denominados *MATN1s* (SEC ID No.5), *MATN1s2* (SEC ID No.13), *MATN1s3* (SEC ID No.14), *MATN1s4* (SEC ID No.15) fueron construidos en el Departamento de Síntesis de Oligonucleótidos del CIGB con el sistema automático "Gene assembler Plus DNA synthesizer" de Pharmacia LKB (Uppsala, Suecia), durante el diseño se tuvo en cuenta un sitio de restricción interno *Stu* I localizado a 21 bases del extremo 3' del gen de la hormona (previamente clonado en el vector pKGEPO1) y se colocó este sitio en el extremo 5' del gen, a continuación se ubicaron las 21 bases del gen *rHuEPO*, luego 33, 45, 48 o 60 bases (codificantes para un espaciador flexible), y finalmente 126 bases correspondientes al extremo 3' del gen *MATN1* humano, un codón de parada y el sitio de reconocimiento para la enzima *Hind* III. En la Figura 6 se exponen esquemáticamente los genes sintéticos *MATN1s1*, *MATN1s2*, *MATN1s3* y *MATN1s4* diseñados para fusionar al extremo 3' del gen *rHuEPO*. Una vez obtenidos los genes de fusión, se subclonaron los mismos en el sitio *EcoR* V del vector pZErO-2.1, de Invitrogen, obteniéndose los vectores pZMATN1, 2, 3 y 4 (Figura 7), en el cual se verificó la secuencia correcta de los genes sintéticos insertados, mediante secuenciación automática, con la utilización de los oligonucleótidos cebadores M13Rev y M13Fw (del kit de secuencia SequenaseTM versión 2.0 de Amersham Int, UK), cuyas secuencias complementarias se encuentran en el plásmido pZErO-2.1 flanqueando al sitio de clonaje múltiple.

Para la construcción de los genes quiméricos *rHuEPO*-*MATN1s1*, *rHuEPO*-*MATN1s2*, *rHuEPO*-*MATN1s3* y *rHuEPO*-*MATN1s4* sobre el vector pKGEPO1 este vector se digirió con las enzimas *Stu* I y *Hind* III, luego de esta reacción enzimática se purificó el fragmento mayor, eliminándose las 21 bases del extremo 3' del gen

ubicadas a continuación del sitio *Stu* I. Por otra parte, los fragmentos sintéticos, correspondientes a los genes *MATN1s1*, *MATN1s2*, *MATN1s3* y *MATN1s4* se extrajeron de los vectores pZMATN1, pZMATN2, pZMATN3 y pZMATN4 respectivamente por digestión con las mismas enzimas (*Stu* I y *Hind* III). Los fragmentos puros de las digestiones se ligaron con T4 ligasa según las condiciones especificadas por el fabricante. A los clones obtenidos se les denominó pEPOMATN1,1, pEPOMATN1,2, pEPOMATN1,3, pEPOMATN1,4, Figura 8. Las secuencias de los mismos se verificó mediante secuenciación automática con los oligonucleótidos descritos.

Para la amplificación y expresión de los genes quiméricos *EPOMATN1,1* (SEC ID No.6), *EPOMATN1,2*, (SEC ID No.16), *EPOMATN1,3* (SEC ID No.17), *EPOMATN1,4* (SEC ID No.18), se seleccionó la línea celular de células de ovario de hámster chino (CHO K1 DUX B11) *dhfr*-(Urlab, G. and Chasin, L. A. (1980) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77, 4216-4220) y el marcador de selección amplificable DHFR para obtener una línea estable productora de la proteína de interés. Para lograr esto se cotransfectó la línea de trabajo con los plásmidos pEPOMATN1 y pED4 (Kaufman, R J., *et al* (1991) *Nucleic Acids Res.* 25, 19(16): 4485–4490), que porta el gen codificante para la dihidrofolato reductasa (DHFR). Las células que incorporaron los genes de interés fueron seleccionadas en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Una vez seleccionadas las líneas estables se verificó una amplificación génica de tres veces, acompañada por un aumento en la expresión de la EPO hasta aproximadamente 33, 29, 30 y 31 pg/célula/día para los clones EPOMATN1,1, EPOMATN1,2, EPOMATN1,3 y EPOMATN1,4 respectivamente, .

Alícuotas de 1 mL de los sobrenadantes de cultivo de las células de CHO portadoras de los genes *EPOMATN1,1*, *EPOMATN1,2*, *EPOMATN1,3* y *EPOMATN1,4* y de células intactas se sometieron a precipitación con TCA y se les realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10 %, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal Anti-EPO-HRP. En la Figura 9 se expone el resultado del experimento donde se verificó la expresión y la identidad inmunológica de la proteína de fusión EPO-MATN1,1, de igual forma se procedió con las moléculas EPO-MATN1,2, EPO-MATN1,3 y EPO-MATN1,4. La masa molecular aproximada de las proteínas quiméricas obtenidas se obtuvo por regresión lineal, realizada con el patrón de masas moleculares transferible (masa

molecular contra distancia de migración); la masa así calculada coincidió en los cuatro casos con la masa esperada.

Purificación de la proteína de fusión EPO-MATN1,1

La EPO-MATN1,1 obtenida mediante el cultivo celular fue aplicada a una columna de SEphadex G-25 previamente equilibrada con el tampón 50 mM de Na₂HPO₄ pH=7. La muestra eluída fue purificada mediante la cromatografía de interacciones metálicas (IMAC). Se empleo la matriz Chelating Sepharose FF (Pharmacia). Se aplicaron 275 mL de la muestra a 1 mL de resina empacada en una columna XK 16/20. Como resultados se obtuvo la EPO-MATN1,1 con una pureza superior al 95%, la cual eluyó en las fracciones correspondiente a 50 mM y 100 mM de Imidazol (Figura 10).

Las fracciones eluidas de la columna de IMAC fueron analizadas mediante la cromatografía de exclusión molecular (Gel filtración –HPLC). Los resultados mostraron la existencias de formas triméricas de la proteína analizada (Figura 11)E el tiempo de vida medio en sangre obtenido en los estudios de farmacocinética fue dos veces mayor al de la EPOhu-r.

EJEMPLO 2. Obtención y caracterización de una proteína de fusión scFv-sMATN1.

Proteína de fusión entre un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA), y un fragmento del extremo carboxilo de la proteína Matrilina 1 humana (sMATN1)

Procedimiento (a) Clonaje y expresión de la proteína de fusión scFv-sMATN1

Se partió del plasmidio pJGm-25, portador del scFv monomérico específico para el CEA (scFv anti-CEA), reportado por Gavilondo C., J et al en "Fragmento de Anticuerpo específico para CEA", WO 2003/093315.

El plasmidio, que aparece en la Figura 12, posee un sitio *Not* I para la inserción de nuevos dominios al extremo C-terminal del scFv y antes de los dominios c-myc y de 6 histidinas. El gen de fusión a insertar en el sitio *Not* I, denominado sMATN1 (Figura 13, SEC ID No.7) se construyó en el Departamento de Síntesis de Oligonucleótidos del CIGB con el sistema automático "Gene assembler Plus DNA synthesizer" de Pharmacia LKB (Uppsala, Suecia). Durante el diseño se tuvo en cuenta añadir un sitio *Not* I y un espaciador flexible en el extremo 5' del gen, y el sitio de reconocimiento para la enzima *Not* I en el extremo 3' del gen. Estas modificaciones hacen posible el clonaje en el plasmidio pJGm-25, de forma que la

proteína de fusión scFv-sMATN1 sea transcripta con los dominios adicionales c-myc y de 6 histidinas Figura 14).

El gen sintético sMATN1 y el plasmidio pJGm-25 se digirieron con la enzima de restricción *Not* I y se ligaron con T4 ADN Ligasa (Promega). Los productos de la
5 reacciones de ligazón se emplearon para la transformación de *E. coli* competentes (cepa XL-1 Blue; Stratagene) mediante electroporación, y las células transformadas se plaquearon en medio sólido selectivo (LB agar, con 100 µg/mL de ampicilina) y se crecieron durante 16 horas a 37°C. Los plásmidos recombinantes se seleccionaron después de la purificación del ADN plasmídico a partir de varias
10 colonias (QIAGEN MiniPrep kit), mediante chequeo por digestión con enzimas de restricción que permiten detectar los productos de ligazón esperados, y la orientación correcta del dominio sMATN1 unido al extremo 3' del scFv anti-CEA. En los análisis de restricción se obtuvieron bandas de aproximadamente 3,6 kb, correspondientes al vector linealizado y de aproximadamente 750 pb para el gen
15 codificante de la fusión scFv-sMATN1.

Se secuenciaron cinco clones de la construcción utilizando cebadores específicos diseñados que hibridan externamente a las regiones de clonaje del vector pJG-1m (Tabla I). La secuencia de bases se realizó mediante secuenciación automática, utilizando un equipo ALFexpress II de Pharmacia (Amersham Biosciences), y el
20 juego "Termo Sequenase Cy 5 Dye Terminator Kit". Las secuencias encontradas concordaron con aquellas de los genes fusionados, sin errores en el marco de lectura y con las adiciones 5'y 3' programadas. Se seleccionó el plasmidio pscFvMATN1.8 como representativo del nuevo gen, empleándose este para el resto de los experimentos.

25 Tabla I. Oligonucleótidos sintéticos para la secuenciación del gen scFv-sMATN1 en el vector pscFvMATN1.8.

Oligo 11. (SEC ID No. 8)

5'...GTTGTTTCCTTTCTATTCTCAC...3'

Oligo 12. (SEC ID No. 9)

30 5'... CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTTC...3'

Con el plasmidio pscFvMATN1.8 se transformaron células competentes TG1 de *E.coli*. Esta cepa permite la expresión periplasmática de la proteína heteróloga, o su salida hacia el medio de cultivo. Las bacterias transformadas se plaquearon en medio sólido selectivo y se dejaron crecer a 37°C por 16 horas. Una colonia

representativa se creció en medio líquido y al alcanzar 1 DO_{530nm} se indujo por 12 horas añadiendo 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Las células se centrifugaron y el contenido periplasmático se aisló mediante shock osmótico y sonicación breve para su evaluación en electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, en condiciones desnaturalizantes. Este ensayo reveló la expresión de una proteína de peso molecular esperado (aprox. 33 kDa), que luego se evaluó por Western Blot utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal específico para el scFv obtenido en conejo, seguido por anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma). La transferencia de las proteínas desde la SDS-PAGE a nitrocelulosa Hybond C Extra (Amersham Life Sciences) se ejecutó en un equipo de transferencia semi-seca (BioRad). En el revelado se empleó DAB (Sigma) como sustrato insoluble. Se pudo evidenciar que la proteína recombinante de la talla mencionada fue adecuadamente identificada por el antisuero específico.

Los métodos generales de biología molecular empleados se describen en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition. Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989.

Procedimiento (b) Reconocimiento específico del CEA humano por la proteína de fusión scFv-sMATN1.

Se realizó un ensayo ELISA recubriendo placas de polivinilo (Costar, 96-well Vinyl Assay Plates) con CEA humano (Calbiochem 219369), a una concentración de 1 µg/mL. Luego de bloqueadas las placas con leche descremada, las muestra de periplasma bacteriano correspondiente a la proteína de fusión scFv-sMATN1 se añadió en diluciones de 1: 5, 1:10 y 1:20 en PBS-leche descremada 2%, e incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se empleó un anticuerpo policlonal específico para el scFv anti-CEA obtenido en conejo, seguido por anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma) para la detección de la unión de la proteína de fusión al CEA. Luego de varios lavados, se emplearon OPD (Sigma) y H₂O₂ como cromógeno y sustrato para el revelado de las reacciones, y un lector LabSystems Multiskan MS para la evaluación cuantitativa de las mismas a 492nm. En el ensayo se utilizó como control positivo el scFv anti-CEA. También se recubrieron placas con los siguientes antígenos irrelevantes: 10 µg/mL de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma), 10 µg/mL de ovalbúmina, 10 µg/mL de lisozima, 10 µg/mL de keyhole limpet haemocyanin (Sigma). En todas las placas se incluyeron pozos donde sólo se colocó solución salina tamponada con fosfatos

(PBS) sin antígeno (blanco). Se consideraron positivos aquellos valores de absorbancia al menos 4 veces mayores que los producidos por los controles negativos.

En estos experimentos las muestras de periplasma de la construcción scFv-sMATN1 y el scFv anti-CEA resultaron positivas en cuanto a su capacidad de reconocimiento de CEA humano adsorbido a placas de polivinilo. Estas mismas muestras fueron negativas para todos los antígenos irrelevantes.

Procedimiento (c) Purificación de la proteína scFv-sMATN1, utilizando cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) y cromatografía de gel filtración

Para la purificación se aprovechó la presencia del dominio de seis histidinas en la proteína recombinante, aportado por el vector base pJGm-25. Estas secuencias confieren a las proteínas una afinidad muy alta por iones metálicos (por ejemplo, Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2}) que pueden ser quelados a diferentes soportes cromatográficos, posibilitando una purificación fácil y reproducible.

Las bacterias recombinantes obtenidas tal como descrito anteriormente se centrifugaron y el contenido periplasmático se aisló mediante shock osmótico y sonicación breve, y posteriormente se dializó por 72 horas en el tampón de acoplamiento (Tris-HCl 20 mM, 1 M NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.0). Las preparaciones de periplasma bacteriano conteniendo la proteína de fusión scFv-sMATN1 se aplicaron directa e independientemente a una matriz de Sefarosa-IDA- Ni^{+2} (InVitrogen). Una vez acopladas las proteínas, los geles se lavaron primero con 10 veces su volumen empleando tampón de acoplamiento y seguidamente de forma similar con el tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM, 1 M NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7.0) para la eliminación de proteínas contaminantes de *E. coli*. La elución del scFv-sMATN1 se realizó con Tris-HCl 20mM, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7.0).

Las muestras de los picos de elución se sometieron a una SDS-PAGE 12% desnaturizante para confirmar la presencia de la proteína de interés de aproximadamente 33 kDa, y luego se analizaron mediante cromatografía de tamiz molecular para determinar la presencia de multímeros. Como control se empleó el scFv anti-CEA purificado de manera semejante a la ya descrita. Se usó Superdex 200 (Pharmacia) y un proceso convencional de filtración en gel mediante un equipo de HPLC. La columna se calibró primero adecuadamente, con un conjunto de proteínas de peso molecular conocido. El scFv anti-CEA se detectó en un pico

mayoritario de aproximadamente 27kDa y con una pureza superior al 95%, todo correspondiente a una forma monomérica. La proteína de fusión scFv-sMATN1 apareció de manera mayoritaria con una talla de aproximadamente 90kDa, que se correspondiente con una forma oligomérica, muy posiblemente trimérica de acuerdo a su peso molecular. Su pureza fue también muy alta.

Procedimiento (d) Determinación de la constante de afinidad de la proteína scFv-sMATN1, purificada mediante IMAC y cromatografía de gel filtración

Para la determinación de la constante de afinidad se utilizó un método de ELISA no competitivo (Beatty JD et al. J. Immunol Meth. 100: 173-184, 1987) basado en la ley de acción de masas. La constante de afinidad K_{aff} es igual a $[AgAb]/[Ag][Ab]$, donde AgAb es el complejo antígeno anticuerpo en L/mol (M^{-1}), [Ag] es la concentración de antígeno libre (mol), y [Ab] es la concentración de anticuerpo libre (mol).

Se emplearon cuatro diluciones dobles seriadas de CEA humano (Calbochem) en el recubrimiento de las placas de ELISA de polivinilo (Costar). Las placas se bloquearon utilizando PBS-leche descremada al 1%. Las muestras (scFv anti CEA y proteína scFv-sMATN1, todos purificados) se aplicaron a las placas a varias concentraciones. Luego de lavados, los pocillos se incubaron con un anticuerpo policlonal específico para el scFv anti-CEA obtenido en conejo, seguido por anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma), ambos durante 1 hora, a 37°C. El sustrato empleado fue OPD y se la reacción se desarrolló durante 15 minutos. La lectura de la absorbancia se realizó a 492 nm en un equipo LabSystems Multiskan MS.

Los valores de densidad óptica (DO) para cada caso se plotearon en el eje de las ordenadas (y), reflejándose en el eje de las abscisas (x) la concentración expresada en ng/mL en una escala de logaritmo base 10. Se tomó la DO 100 como aquella a la cual la señal se mantenía al máximo. Para cada curva se calculó la mitad de la DO 100 (DO 50). Se determinaron los valores de concentración de la muestra a DO 50 para cada curva, y se realizaron los cálculos de la afinidad mediante la siguiente formula: $K_{aff} = (n-1)/2(n)$, donde $n = [Ab']_t/[Ab]_t$. $[Ab']_t$ es el valor de concentración de la muestra que corresponde a un valor de DO 50 para la concentración mayor de antígeno a comparar y $[Ab]_t$ es el valor de concentración de muestra que corresponde a un valor de DO 50 para la concentración menor de

antígeno a comparar. Se realizaron las seis determinaciones de afinidad posibles para las curvas obtenidas, estimándose la Kaff final como el promedio de estas.

Tabla II. Valores de constante de afinidad

Muestra ensayada	Kaff (L mol ⁻¹)
Proteína scFv-MATN1	$(8.5 \pm 0.4) \times 10^{10}$
scFv	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^9$

- 5 Kaff: constante de afinidad, calculada como promedio de seis determinaciones $\pm$ la desviación estándar (entre paréntesis).

La Tabla II refleja los valores de Kaff calculados para cada una de las variantes ensayadas. La proteína scFv-sMATN1 posee una Kaff mas de un orden y medio de magnitud mayor que la obtenida para el scFv anti-CEA, lo que sólo se explica
10 aduciendo a que la primera molécula ha aumentado su avidez por el antígeno por su nuevo carácter oligomérico ya identificado mediante filtración en gel.

EJEMPLO 3. Estudio de la actividad específica de las proteínas híbridas obtenidas por vía recombinante unida a la MATN.

- 15 Las construcciones de EPO fusionada a la matrilina con los diferentes espaciadores fueron purificadas y se le determinó la actividad biológica empleando el método de Mari Cote (Mari Cote P, Vanghan R. Bio-assay erythropoietin in mice make polycitemic by exposure to air and a reduced pressure. Nature 1961;191(4793):1065–7). Los resultados son mostrados en la tabla III donde se
20 puede observar el incremento de la actividad específica de las moléculas de EPO fusionadas con respecto a la molécula sin modificar. Estos resultados no fueron afectados al emplear distintos espaciadores.

Tabla III. Resultados de la actividad específica de las diferentes construcciones de EPO fusionada a la matrilina empleando varios tipos de espaciadores.

25

Proteínas	Actividad específica (UI/mg)
EPO recombinante	121 225
EPOMATN1,1	240 117
EPOMATN1,2	198 256
EPOMATN1,3	235 420
EPOMATN1,4	217 527

EJEMPLO 4. Estudio de la inmunogenicidad de proteínas híbridas obtenidas por vía recombinante unidas a MATN1.

Teniendo en cuenta que los fármacos biológicos son obtenidos por vía recombinante y expresados en células de mamíferos no humanos, o de microorganismos, existe la posibilidad de que el uso prolongado de estos productos pueda generar la aparición de anticuerpos contra estas proteínas en los pacientes tratados. Estos anticuerpos pueden neutralizar la acción de la droga endógena y provocar trastornos durante la terapia como falta de eficacia, reacciones adversas (hipersensibilidad) o competir con la proteína endógena (EPO) y comprometer la vida de los pacientes.

El nivel de inmunogenicidad de las proteínas producidas por nosotros para uso clínico es muy baja (ver tabla IV).

Tabla IV. Inmunogenicidad de proteínas recombinantes producidas por nosotros empleadas en ensayos clínicos.

	IFN alfa 2b	EPO	G-CSF	EGF
Evaluados	616	184	500	100
Positivos	11	1	0	0
Inmunogenicidad	1.7%	0.54%	0%	0%

El procedimiento empleado para la determinación de anticuerpos en el suero de los pacientes tratados consistió en un ELISA tipo "Sandwich". Los anticuerpos contra las proteínas evaluadas contenidos en las muestras se unen en un primer tiempo a la proteína para la que se evalúa los anticuerpos acoplada a la fase sólida, la proteína A acoplada a la enzima peroxidasa reconoce a los anticuerpos en un segundo tiempo, permitiéndole adquirir la capacidad de transformar un sustrato específico que es indicador de la presencia o no de tales anticuerpos en la muestra. Para evaluar la antigenicidad de las moléculas recombinantes híbridas acopladas con MATN1(IFN alfa2b-MATN1, EPO-MATN1,G-CSF-MATN1,EGF-MATN1 y HGH-MATN1) se inmunizaron grupos de 120 ratones BALB/c/machos entre 16 y 18 gramos de peso y con una edad entre 30-38 semanas con cada una de las preparaciones de proteínas descritas anteriormente, así como con sus homólogos sin MATN1:

1- IFN alfa 2b,

- 2- EPO,
- 3- G-CSF,
- 4- EGF.

5 **Descripción del diseño experimental.**

Se empleó la vía subcutánea para la inmunización (Biotecnología Aplicada 2002; 19(1):15-18). Se le administró a los ratones 1 microgramo de proteína recombinante o proteína recombinante-MATN1 por cada inmunización 3 veces por semana.

10 Cada grupo de animales (que recibió cada variante de proteína, N=40) se dividió en otros cuatro de iguales cantidades (N=10) que fueron sacrificados cada semana para conocer los títulos de anticuerpos correspondiente a cada proteína en evaluación. Los sacrificios se hicieron siempre después de transcurridos al menos 3 días entre la última administración la extracción de sangre. Esto se realizó con el
15 objetivo de permitir el tiempo necesario para el aclaramiento plasmático de las proteínas, evitándose que se encuentre enlazada a los anticuerpos a detectar y se produzca un enmascaramiento de los mismos en la determinación por el sistema ELISA.

Condiciones experimentales.

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($19 \pm$
20 20°C) y humedad (55-65%), con ingestión de agua y pienso peletizado ad libitum. Estuvieron 15 días en aclimatación y posteriormente se distribuyeron en 10 en cajas con el tamaño adecuado.

Las extracciones sanguíneas se realizaron mediante el método de disección ocular, método de extracción final sencillo y rápido que permite obtener un alto volumen de
25 sangre antes de la coagulación de la misma.

Después de la coagulación y la retracción del coágulo las muestras se centrifugaron 5 minutos a 12 000 r.p.m. Se separó el suero y se coló en otros tubos previamente rotulados con un número asignado aleatoriamente a cada uno de los ratones del ensayo para ser analizados por ELISA.

30 **Inmunogenicidad comparada entre las variantes de proteínas recombinantes y sus homólogos con -MATN1 s.**

Se realizaron los ELISAS de todas las muestras colectadas de los animales según el diseño experimental. En cada tiempo se muestra la media $\pm$ el rango intercuartile

de los logaritmos de los títulos de anticuerpos. En la primera semana no se detectan anticuerpos. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las variantes de proteínas recombinantes y sus homólogos con MATN1 utilizando la prueba de U de Mann-Whitney (ver tabla V).

- 5 Tabla V. Inmunogenicidad comparada entre las variantes de proteínas recombinantes y sus homólogos con MATN1.

	Proteína recombinante					Proteína recombinante-MATN1				
Semana	IFN alfa 2b	EPO	G- CSF	EGF	HGH	IFN alfa 2b	EPO	G-CSF	EGF	HGH
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2.8 ± 0.6	1.1 ± 0.7	1.9 ± 0.8	1.9 ± 0.6	1.8 ± 0.8	2.7 ± 0.1	1.4 ± 0.8	1.9 ± 0.8	2.0 ± 0.4	1.1 ± 0.5
3	2.8 ± 0.8	1.1 ± 0.4	2.9 ± 0.7	2.0 ± 0.3	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.5	1.3 ± 0.4	2.9 ± 0.7	2.0 ± 0.8	1.7 ± 0.4
4	3.1 ± 0.5	2.2 ± 0.6	3.0 ± 0.3	2.5 ± 0.9	2.6 ± 0.8	3.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2	3.0 ± 0.3	2.6 ± 0.5	2.8 ± 0.6

Estos datos muestran que en los animales los niveles de inmunogenicidad entre las variantes de proteínas son similares. Sobre esta base y los resultados obtenidos en

10 pacientes podemos asumir que las variantes de proteínas recombinantes-MATN1 pueden ser de muy baja inmunogenicidad.

REIVINDICACIONES

1. Proteína quimérica caracterizada porque contiene esencialmente el extremo carboxilo de la Matrilina 1, identificada en el listado de secuencias como Seq. ID. No.19 desde el aminoácido número 206 hasta el 246, y una proteína de uso terapéutico, fusionadas mediante un espaciador aminoacídico, la cual tiene una vida media y una actividad específica mayor que la proteína de uso terapéutico no fusionada.
2. Proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el espaciador aminoacídico puede ser de tamaño variable como los identificados en el listado de secuencias como Seq. ID. No.1 (aminoácido número 194 hasta el 204), o Seq. ID. No.10 (aminoácido número 194 hasta el 208), o Seq. ID. No.11 (aminoácido número 194 hasta el 209), o Seq. ID. No.12 (aminoácido número 194 hasta el 246).
3. Proteína quimérica de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 2 caracterizada por contener cualquiera de las siguientes proteínas: Epo hr, GSCF, EGF, HGH, IFN alfa 2b rec, IFN alfa-2a rec, IFN Gamma, Estreptokinasa recombinante, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales.
4. Proteína quimérica según reivindicaciones 1 – 3, caracterizada por poseer la misma magnitud e inmunogenicidad que su homólogo sin MATN1 en ratones.
5. Proteína quimérica según reivindicaciones 1 – 4, caracterizada por poseer un bajo nivel de inmunogenicidad en humanos.

Figura 1

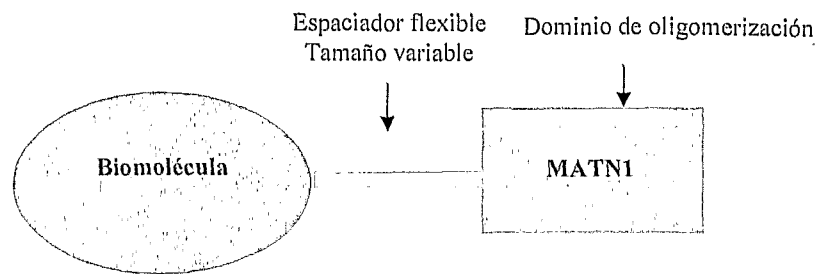


Figura 2

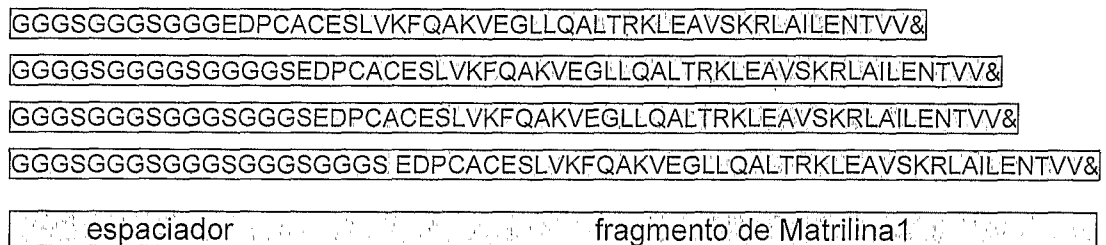


Figura 3

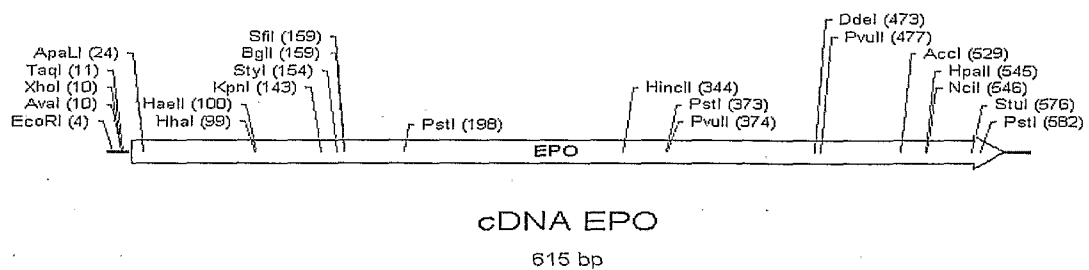


Figura 4

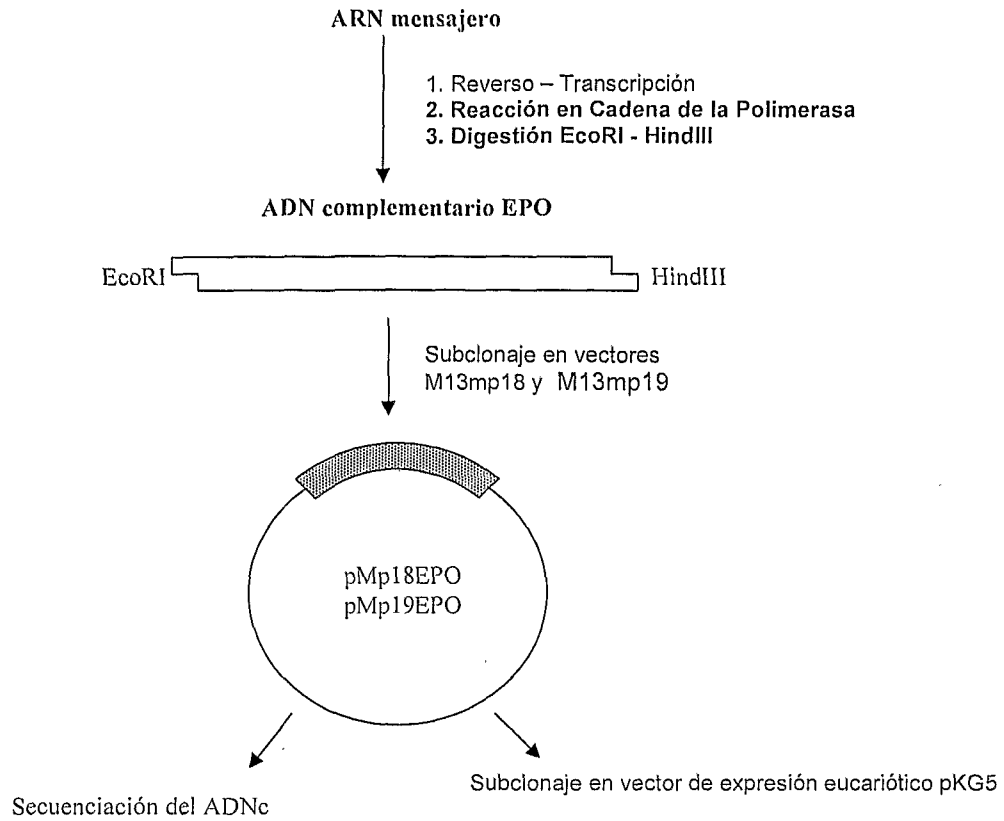


Figura 5

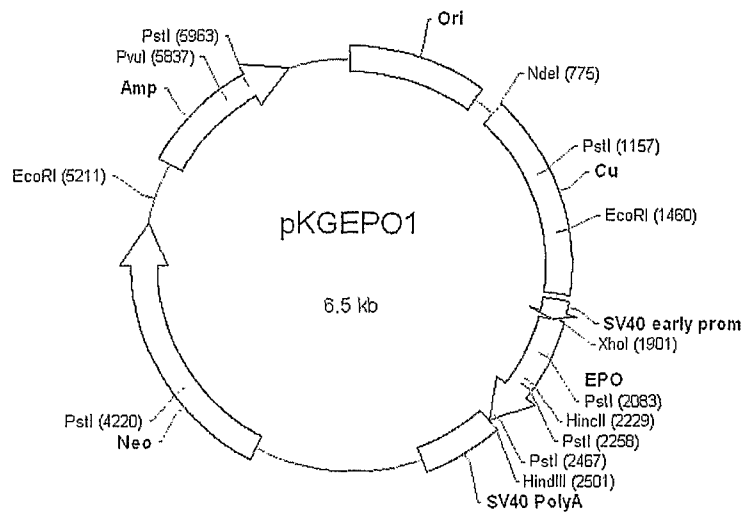


Figura 6

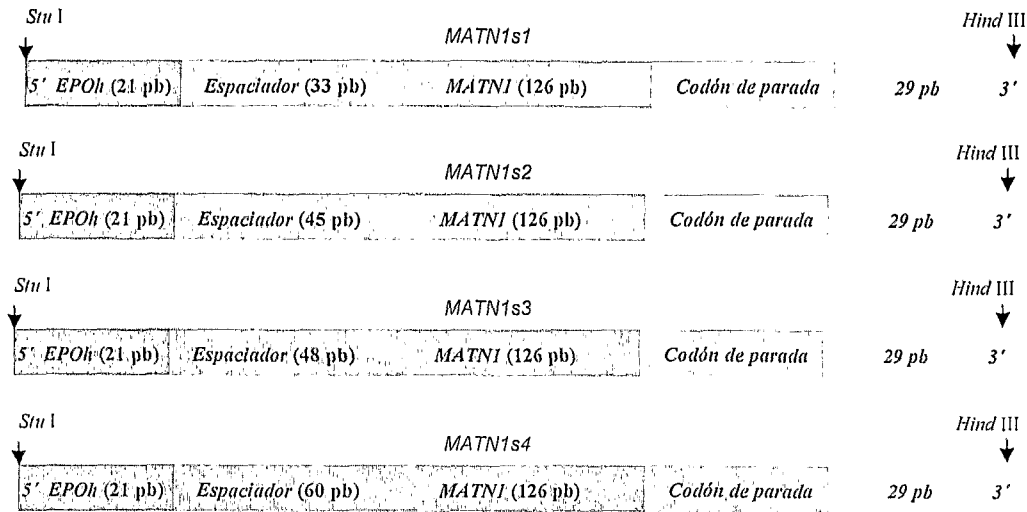
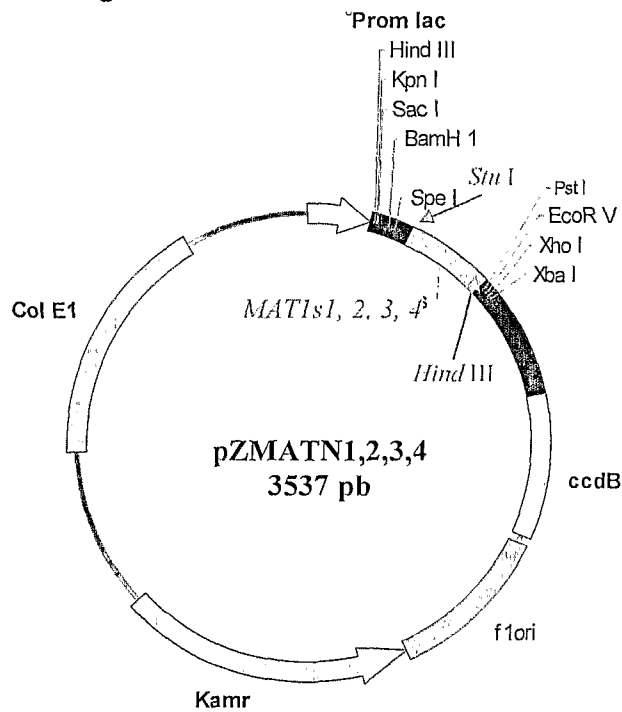
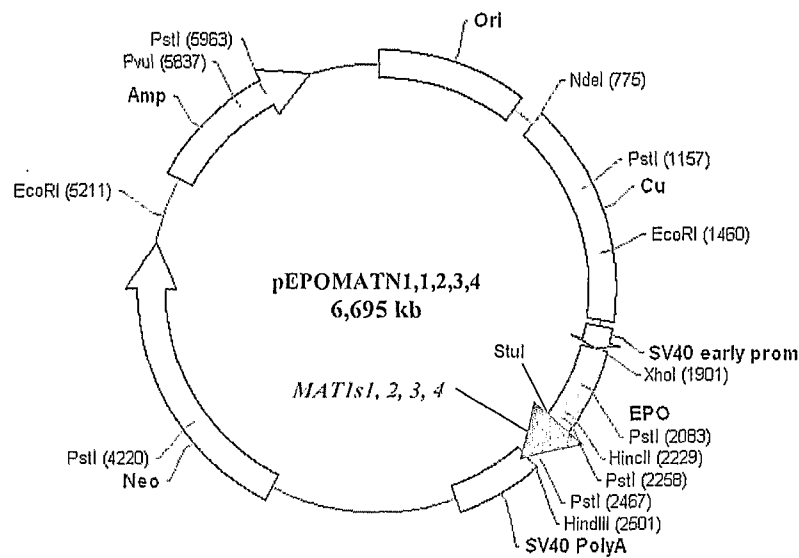


Figura 7



Los cuatro vectores pZMAT1s1, pZMAT1s2, pZMAT1s3, pZ MAT1s4
Difieren entre ellos en el dominio de
multimerización MAT1s1, MAT1s2, MAT1s3
y MAT1s4 respectivamente

Figura 8



Los cuatro vectores
pEPOMAT1,1 pEPOMAT1, 2
pEPOMAT1,3 y pEPOMAT1, 4
Difieren entre ellos en el dominio
de multimerización *MATIs1*,
MATIs2, *MATIs3* y *MATIs4*
respectivamente

Figura 9

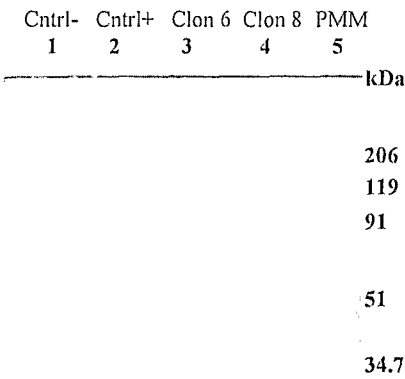


Figura 10

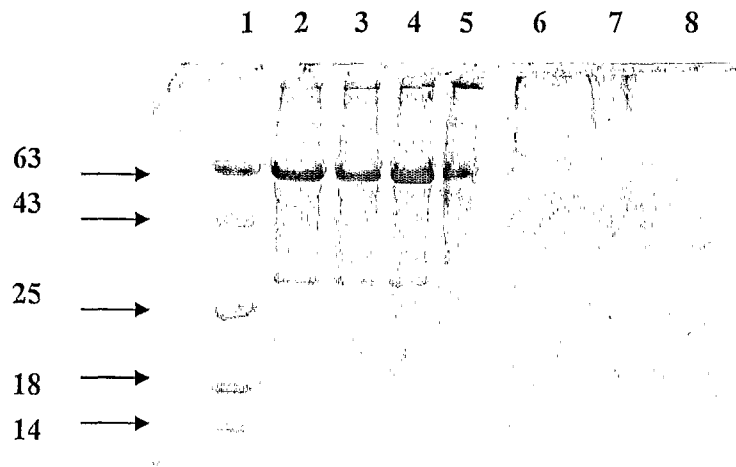


Figura 11

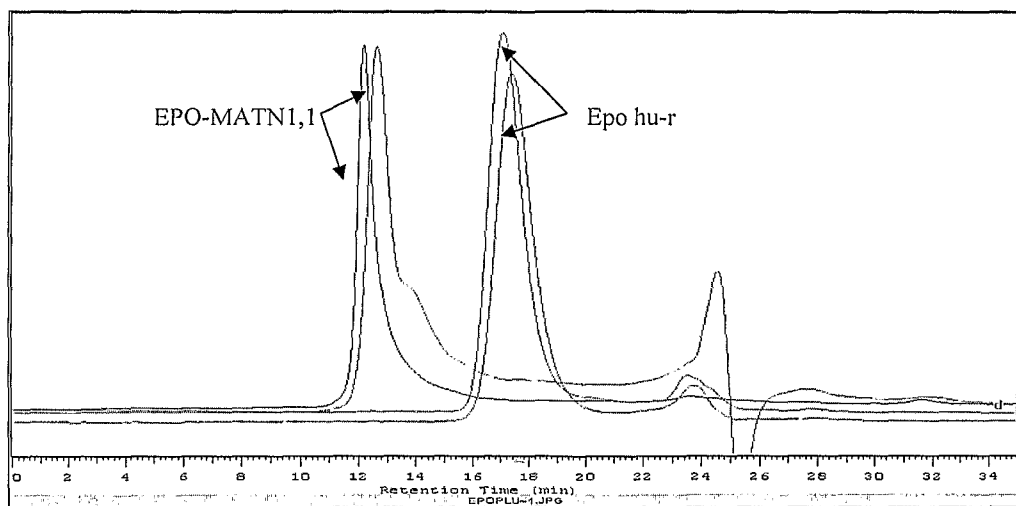


Figura 12

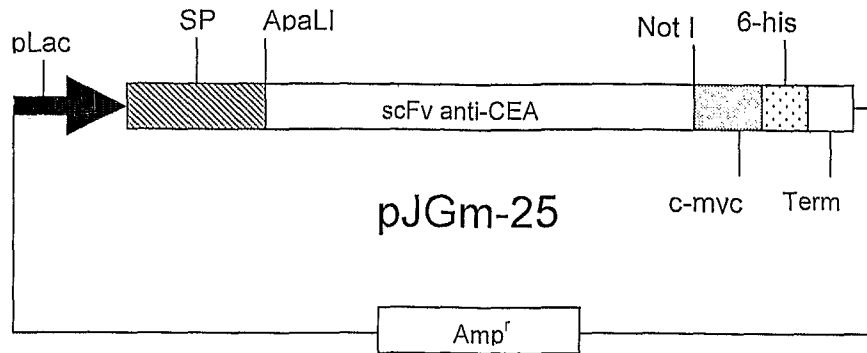


Figura 13

AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGGCGGCGGGTCCGGCGGCGGGTCCGGCGGC
 GGGGAGGACCCCTGCGCCTGCGAGTCCCTGGTGAAGTTCCAGGCCAAGGT
 GGAGGGCCTGCTGCAGGCCCTGACCCGCAAGCTGGAGGCCGTGTCCAAGC
 GCCTGGCCATCCTGGAGAACACCGTGGTGGCGGCCGCTTTTAT

Figura 14

