

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 090**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/765** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2002 E 10075030 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2261250**

54 Título: **Proteínas de fusión de albúmina y GCSF**

30 Prioridad:

21.12.2001 US 341811 P	24.01.2002 US 350358 P
28.01.2002 US 351360 P	26.02.2002 US 359370 P
28.02.2002 US 360000 P	27.03.2002 US 367500 P
08.04.2002 US 370227 P	10.05.2002 US 378950 P
24.05.2002 US 382617 P	28.05.2002 US 383123 P
05.06.2002 US 385708 P	10.07.2002 US 394625 P
24.07.2002 US 398008 P	09.08.2002 US 402131 P
13.08.2002 US 402708 P	18.09.2002 US 411426 P
18.09.2002 US 411355 P	02.10.2002 US 414984 P
11.10.2002 US 417611 P	23.10.2002 US 420246 P
05.11.2002 US 423623 P	

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.09.2015**

73 Titular/es:

**HUMAN GENOME SCIENCES, INC. (50.0%)**  
**14200 Shady Grove Road**  
**Rockville, MD 20850, US y**  
**NOVOZYMES BIOPHARMA DK A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BALLANCE, DAVID JAMES;**  
**TURNER, ANDREW JOHN;**  
**ROSEN, CRAIG A;**  
**HASELTINE, WILLIAM A y**  
**RUBEN, STEVEN M**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 545 090 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de albúmina y GCSF

**Antecedentes de la invención**

5 La invención se refiere en general a proteínas terapéuticas condensadas a albúmina. La invención abarca polinucleótidos que codifican proteínas terapéuticas de fusión de albúmina, proteínas terapéuticas de fusión de albúmina, para su uso en medicina. Las células huésped transformadas con los polinucleótidos que codifican proteínas terapéuticas de fusión de albúmina también entran dentro de la invención, así como los procedimientos para fabricar las proteínas de fusión de albúmina de la invención usando estos polinucleótidos y/o células huésped.

10 La seroalbúmina humana (HSA o HA), una proteína de 585 aminoácidos en su forma madura (como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N.º: 1038)), es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como vehículo de ligandos endógenos y exógenos. En la actualidad, la HA para uso clínico se produce mediante extracción de sangre humana. La producción de HA recombinante (rHA) en microorganismos se ha divulgado en los documentos EP 330 451 y EP 361 991.

15 Las proteínas terapéuticas en su estado nativo o cuando se producen de forma recombinante, tales como interferones y hormonas de crecimiento, normalmente son moléculas lábiles que exhiben semividas cortas, en particular cuando se formulan en soluciones acuosas. La inestabilidad en estas moléculas cuando se formulan para administración dicta que muchas de las moléculas se deben liofilizar y refrigerar en todo momento durante el almacenamiento, de modo que hace que las moléculas sean difíciles de transportar y/o almacenar. Los problemas de almacenamiento son particularmente agudos cuando las formulaciones farmacéuticas se deben almacenar y dispensar fuera del entorno hospitalario.

20

Se han propuesto pocas soluciones prácticas a los problemas de almacenamiento de las moléculas proteicas lábiles. De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de formulaciones de larga duración estabilizadas de moléculas terapéuticas proteináceas que se dispensan fácilmente, preferentemente con una sencilla formulación que requiere una mínima manipulación posterior al almacenaje.

**Sumario de la invención**

25 La expresión "una proteína terapéutica" usado en esta memoria descriptiva hace referencia a la forma madura del factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF).

30 La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia líder y una proteína de fusión de la albúmina, que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia líder de seroalbúmina humana (HSA)/kex2, un polinucleótido que codifica la seroalbúmina humana madura, un polinucleótido que codifica un factor estimulante de las colonias de granulocitos maduro (G-CSF) y una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia promotora, una secuencia de marcador seleccionable y una región para la terminación de la transcripción, en el que la secuencia líder de seroalbúmina humana (HSA)/kex2 está fusionada al extremo N de dicha seroalbúmina madura, en la que dicha seroalbúmina madura está fusionada al extremo N del G-CSF maduro y en el que dicha proteína de fusión de albúmina tiene actividad G-CSF. En una realización, la molécula de ácido nucleico es parte de un casete de expresión. Adicionalmente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende el ADNc contenido en el número de depósito en la ATCC PTA-3766.

35

40 La presente invención también proporciona un vector que comprende las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente. En una realización, el vector comprende un promotor y una región de terminación asociadas operativamente a una molécula de ácido nucleico, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la construcción contenida en el número de depósito en la ATCC, PTA-3766, en la que dicha secuencia líder es una secuencia líder HSA/kex2 híbrida que comprende los aminoácidos de la SEC ID N.º: 1111. En otra realización, el vector comprende un promotor y una región de terminación asociadas operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia líder y una proteína de fusión de albúmina que comprende aminoácidos 1 a 783 de SEC ID N.º: 226, en la que dicha secuencia líder es una secuencia líder HSA/kex2 híbrida que comprende los aminoácidos de SEC ID N.º: 1111. En una realización, el promotor es un promotor PRB1. En una realización, el vector es un vector de expresión pSAC35.

45

50 La presente invención proporciona una célula huésped que comprende un vector según se describe anteriormente. En una realización, la célula huésped es una célula de levaduras. En otra realización, la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. En aún otra realización, la célula de levadura es deficiente en glucosilación y/o deficiente en proteasas.

La presente invención también proporciona un procedimiento de producir una proteína de fusión de albúmina que comprende:

55 (a) cultivar una célula huésped según se describe en condiciones adecuadas para expresión de la proteína de fusión de albúmina; y

(b) aislar la proteína de fusión de albúmina.

La presente invención también proporciona una proteína de fusión albúmina-G-CSF codificada por la molécula de ácido nucleico para uso en medicina. En una realización, la proteína de fusión albúmina-G-CSF se usa en el tratamiento de trastornos inflamatorios, cáncer, leucemia, tales como leucemia mielocítica, leucemia mielógena aguda y leucemia linfoblástica aguda, neutropenia, tal como neutropenia primaria (por ejemplo síndrome de Kostmann), neutropenia secundaria, neutropenia en pacientes infectados por el VIH y neutropenia asociada con quimioterapia, infecciones asociadas con neutropenia, mielodisplasia, enfermedades y trastornos autoinmunes, soriasis, cicatrización de heridas, linfoma, tal como linfoma no hodkiniano, enfermedad de Hodgkin o enfermedad de almacenamiento de glucógeno o para la prevención de trastornos inflamatorios, neutropenia, tal como neutropenia en pacientes infectados con VIH o neutropenia asociada con quimioterapia. En otra realización, la proteína de fusión albúmina-G-CSF codificada se puede usar en la diagnosis de enfermedades inflamatorias.

En el presente documento también se divulgan formulaciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de la albúmina de la invención y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas formulaciones pueden estar en un kit o recipiente. Dicho kit o recipiente puede estar envasado con instrucciones pertenecientes a la semivida prolongada de la proteína terapéutica. Dichas formulaciones se pueden usar en procedimientos de tratamiento, prevención, mejora o diagnóstico de una enfermedad o síntomas de enfermedades en un paciente, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, que comprende la etapa de administrar la formulación farmacéutica al paciente.

En el presente documento también se divulgan procedimientos de prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad o trastorno. En realizaciones preferidas, la presente invención abarca proteínas de fusión de la albúmina para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno enumerado en la columna "Indicación Preferida: Y", de la Tabla 1 que comprende administrar a un paciente en el que se desea dicho tratamiento, prevención o mejora una proteína de fusión de la albúmina de la invención que comprende una proteína terapéutica o una porción correspondiente a una proteína terapéutica (o fragmento o variante de la misma) divulgada en la columna de "Proteína terapéutica: X" de la Tabla 1 (en la misma fila que la enfermedad o trastorno que se va a tratar se indica en la columna "Indicación preferida: Y" de la Tabla 1) en una cantidad eficaz para tratar, prevenir o mejorar la enfermedad o trastorno.

La proteína de fusión de la albúmina descrita en la Tabla 1 o 2 tiene una semivida ampliada.

La proteína de fusión de la albúmina descrita en la Tabla 1 o 2 es más estable que la correspondiente molécula terapéutica sin condensar descrita en la Tabla 1.

En el presente documento también se divulgan organismos transgénicos modificados para que contengan moléculas de ácido nucleico de la invención (los polinucleótidos descritos en las Tablas 1 y 2), preferentemente, modificados para que expresen una proteína de fusión de la albúmina de la invención.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1A-D muestra la secuencia de aminoácidos de la forma madura de la albúmina humana (SEC ID N° 1038) y un polinucleótido que la codifica (SEC ID N° 1037).

La Figura 2 muestra el mapa de restricción del depósito ATCC PTA-3278 vector de clonación pPPC0005.

La Figura 3 muestra el mapa de restricción del vector de expresión de la levadura *S. cerevisiae* pSAC35 (Sleep *et al.*, BioTechnology 8:42 (1990)).

La Figura 2 muestra el efecto de varias diluciones de las proteínas de fusión de albúmina GCSF codificadas por el ADN comprendido en las CID 1642 y 1643, en proliferación celular NFS-60 (véase el ejemplo comparativo 1 y el ejemplo 8). (■) CID 1642; (▲) = CID 1643; (○) = HSA.

La Figura 5 muestra el efecto del GCSF humano recombinante (Neupogen) y proteína de fusión de albúmina GCSF en el recuento de glóbulos blancos total (véase el Ejemplo Comparativo 1). WBC totales ( $10^3$  cells/ $\mu$ l) en cada día se presentan como la media del grupo  $\pm$  EEM. La proteína de fusión de albúmina GCSF se administró subcutáneamente bien a 25 o bien a 100 ug/kg cada 4 días x 4 (Q4D), o a 100 ug/kg cada 7 días x 2 (Q7D). Los datos de los días 8 y 9 para la proteína de fusión de albúmina GCSF 100 ug/kg Q7 se presentan como días 9 y 10, respectivamente, para facilitar comparación con otros grupos. Los controles fueron vehículo salino administrado subcutáneamente cada 4 días x 4 (vehículo Q4D), o Neupogen administrado subcutáneamente diariamente x 14 (Neupogen 5 ug/kg QD). El periodo de tratamiento se considera días 1-14 y el periodo de recuperación, días 15-28.

### Definiciones

Las definiciones siguientes se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados en la presente memoria.

Como se usa en el presente documento, "polinucleótido" hace referencia a una molécula de ácido nucleico que tiene

una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende o, como alternativa que consiste en, una molécula de albúmina unida en el marco a una proteína terapéutica X; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende, o, como alternativa que consiste en, la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° Y (como se describe en la columna 6 de la Tabla 2); una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende, o, como alternativa que consiste en, la secuencia mostrada en la SEC ID N° X; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende, o, como alternativa que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° Z; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención generada como se describe en la Tabla 2 o en los ejemplos; una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de albúmina terapéutica de la invención, una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos contenida en una construcción de fusión de albúmina descrita en la Tabla 2, o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos contenida en una construcción de fusión de albúmina depositada en la ATCC (como se describe en la Tabla 3).

Como se usa en el presente documento, "construcción de fusión de albúmina" hace referencia a una molécula de ácido nucleico que comprende o, como alternativa, que consiste en, un polinucleótido que codifica una molécula de albúmina unida en el marco a un polinucleótido que codifica una molécula de una proteína terapéutica, una molécula de ácido nucleico que comprende, o, como alternativa, que consiste en, un polinucleótido que codifica una molécula de albúmina unida en el marco a un polinucleótido que codifica una molécula de una proteína terapéutica generada como se describe en la Tabla 2 o en los Ejemplos; o una molécula de ácido nucleico que comprende, o, como alternativa, que consiste en, un polinucleótido que codifica una molécula de albúmina unida en el marco a un polinucleótido que codifica una molécula de una proteína terapéutica que además comprende, por ejemplo, uno o más de los elementos siguientes: (1) un vector de autorreplicación funcional (incluido, entre otros, un vector lanzadera, un vector de expresión, un vector de integración y/o un sistema de replicación), (2) una región para el inicio de la transcripción (p. ej., una región promotora, tal como, por ejemplo, un promotor regulable o inducible, un promotor constitutivo), (3) una región para la terminación de la transcripción, (4) una secuencia líder y (5) un marcador seleccionable. El polinucleótido que codifica la proteína terapéutica y la proteína albúmina, una vez parte de la construcción de fusión de albúmina, puede, cada uno, denominarse "porción", "región" o "resto" de la construcción de fusión de albúmina.

La presente invención se refiere, en general, a polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina – interferón-beta y a su uso en el tratamiento, prevención o mejora de enfermedades o trastornos. Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión de albúmina" se refiere a una proteína formada por la fusión de una molécula de albúmina a una molécula de una proteína terapéutica. Una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende una proteína terapéutica y seroalbúmina humana, que se asocian entre sí mediante fusión genética (es decir, la proteína de fusión de albúmina se genera mediante traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica está unido en el marco con un polinucleótido que la albúmina). La proteína terapéutica y la proteína albúmina, una vez que forman parte de la construcción de fusión de albúmina, pueden, cada una, denominarse "porción", "región" o "resto" de la proteína de fusión de albúmina (p. ej., una "porción de la proteína terapéutica" o una "porción de la proteína albúmina").

En una realización preferida adicional, una proteína de fusión de albúmina de la invención es procesada por una célula huésped y secretada al medio de cultivo que la rodea. El procesamiento de la proteína de fusión de albúmina naciente que se produce en las vías secretoras del huésped usadas para la expresión pueden incluir, entre otros, escisión del péptido señal, formación de enlaces disulfuro, plegamiento adecuado, adición y procesamiento de hidratos de carbono (tales como, por ejemplo, glucosilación unida a N y O), escisiones proteolíticas específicas y ensamblaje en proteínas multiméricas. Una proteína de fusión de albúmina de la invención está, preferentemente, en forma procesada. En una realización más preferida, la "forma procesada de una proteína de fusión de albúmina" hace referencia a un producto de la proteína de fusión de albúmina que ha sufrido escisión del péptido señal en N-terminal, en el presente documento también se denomina "proteína de fusión de albúmina madura".

En varios casos, un clon representativo que contiene una construcción de fusión de albúmina de la invención se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (en el presente documento denominada "ATCC®"). Además, es posible recuperar una construcción de fusión de albúmina dada del depósito mediante técnicas conocidas en la técnica y se describen en otros lugares del presente documento. La ATCC® se encuentra en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 201102209, EE.UU. Los depósitos en la ATCC® se han hecho bajo los términos del Tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimiento de patente.

En una realización, la invención proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina que comprende, o, como alternativa, que consiste en, una proteína terapéutica y una proteína de seroalbúmina. En una realización adicional, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o, como alternativa, que consiste en, una proteína terapéutica y una proteína de seroalbúmina. En una realización preferida, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende o, como alternativa, que consiste en, una proteína terapéutica y una proteína seroalbúmina codificada por un polinucleótido descrito en la Tabla 2. En una

realización preferida adicional, la invención proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina cuya secuencia se muestra como SEC ID N° Y en la Tabla 2. El componente de proteína de seroalbúmina de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la seroalbúmina. La invención abarca además polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión de albúmina.

- 5 La porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la proteína terapéutica.

La invención abarca adicionalmente polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión de albúmina.

### **Proteínas terapéuticas**

- 10 Como se ha indicado anteriormente, un polinucleótido de la invención codifica una proteína que comprende, o, como alternativa, que consiste en, una proteína terapéutica y seroalbúmina humana, que se asocian entre sí, preferentemente mediante fusión genética.

Como se usa en el presente documento, "proteína terapéutica" se refiere a proteína G-CSF madura, que tiene una o más actividades terapéuticas y/o biológicas.

- 15 Con proteína que es "terapéuticamente activa" se quiere decir un polipéptido que posee una o más actividades biológicas y/o terapéuticas conocidas asociadas con la proteína terapéutica, tal como una o más de las proteínas terapéuticas descritas en el presente documento o, por otro lado, conocida en la técnica. Como ejemplo no limitante, una "proteína terapéutica" es una proteína que es útil para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad, afección o trastorno. Como ejemplo no limitante, una "proteína terapéutica" puede ser una que se une específicamente a un tipo de célula concreta (normal (p. ej., linfocitos) o anormal (p. ej., células de cáncer)) y por tanto, se puede usar para  
20 dirigir un compuesto (fármaco o agente citotóxico) a dicho tipo de célula específicamente.

- Como se usa en el presente documento, "actividad terapéutica" o "actividad" puede hacer referencia a una actividad cuyo efecto es consistente con un desenlace terapéutico deseable en seres humanos o a los efectos deseados en mamíferos no humanos o en otras especies u organismos. La actividad terapéutica se puede medir *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, se puede analizar un efecto deseable en un cultivo celular. Ejemplos de ensayos incluyen, entre otros,  
25 los descritos en el presente documento en la sección de Ejemplos o en la columna "Ejemplo de ensayo de actividad" (columna 3) de la Tabla 1

- Las proteínas terapéuticas correspondientes a la porción de una proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, tales como proteínas de superficie celular y secretoras, a menudo se modifican mediante la unión de uno o más grupos de oligosacáridos. La modificación, denominada glucosilación, puede afectar espectacularmente a las propiedades físicas de las proteínas y puede ser importante en la estabilidad, secreción y localización de proteínas. La glucosilación se produce en localizaciones específicas en la estructura del polipéptido. Normalmente hay dos tipos principales de glucosilación: glucosilación caracterizada por oligosacáridos unidos a O, que están unidos a residuos de serina o treonina; y glucosilación caracterizada por oligosacáridos unidos a N que están unidos a residuos de asparagina en una secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Normalmente, el ácido N-acetilneuramínico (también conocido como ácido siálico) es el residuo terminal de los oligosacáridos unidos a N y unidos a O. Variables tales como la estructura de la proteína y el tipo celular influyen sobre el número y la naturaleza de las unidades de carbohidrato dentro de las cadenas en diferentes sitios de glucosilación. Los isómeros de glucosilación también son habituales en el mismo sitio dentro de un tipo celular dado.

- 40 La célula huésped en la que se expresan puede modificar las proteínas terapéuticas correspondientes a la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención, de un modo tal que la glucosilación en uno o más sitios se altera como resultado de manipulación(es) de su secuencia de ácidos nucleicos, o se pueden modificar debido a otras condiciones de su expresión. Por ejemplo, se pueden producir los isómeros de glucosilación anulando o introduciendo sitios de glucosilación, por ejemplo mediante sustitución o delección de residuos de aminoácidos, tal como la sustitución de glutamina por asparagina, o se pueden producir proteínas recombinantes no glucosiladas mediante la expresión de proteínas en células huésped que no las glucosila, por ejemplo en *E. coli* o en levaduras con glucosilación deficiente. Estos enfoques se describen más detalladamente más adelante y se conocen en la técnica.

- Las proteínas terapéuticas, particularmente las divulgadas en la Tabla 1 y sus secuencias de ácido nucleico y aminoácidos son bien conocidas en la técnica y están disponibles en las bases de datos públicas, tales como las bases de datos de servicios de abstracción química (p. ej., el registro CAS), GenBank y bases de datos con suscripción como GenSeq (p. ej., Derwent). Ejemplos de secuencias de nucleótidos de las proteínas terapéuticas que se puede usar para derivar un polinucleótido de la invención se muestran en la columna 7, "SEC ID N° X" de la tabla 2. Las secuencias mostradas como SEC ID N° X pueden ser una secuencia de polinucleótidos silvestre que codifica una proteína terapéutica dada (p. ej., de longitud larga o madura) o, en algunos casos, la secuencia puede ser una variante de dicha secuencia de polinucleótidos silvestre (p. ej., un polinucleótido que codifica la proteína terapéutica silvestre en la que la secuencia de ADN de dicho polinucleótido se ha optimizado, por ejemplo para la expresión en una especie concreta; o un polinucleótido que codifica una variante de la proteína terapéutica silvestre

(es decir, un mutante dirigido a sitio; una variante alélica)). Está dentro de la capacidad del experto en la técnica usar la secuencia mostrada como SEC ID N° X para derivar la construcción descrita en la misma fila. Por ejemplo, si la SEC ID N.º: X corresponde a una proteína de longitud larga, pero solo una porción de dicha proteína se usa para generar la CID específica, entra dentro de la experiencia en la técnica usar técnicas de biología molecular, tales como PCR, para amplificar el fragmento específico y clonarlo en el vector adecuado.

5 La tabla 1 proporciona una lista de proteínas terapéuticas que corresponden a una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina de la invención o una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido de la invención. La primera columna "Proteína terapéutica X" divulga moléculas de proteína terapéutica a la que le puede seguir entre paréntesis nombres científicos y de marcas de proteínas que comprenden o, como alternativa, consisten en, la molécula de proteína terapéutica o un fragmento o variante de la misma. La "proteína terapéutica X" como se usa en el presente documento, puede hacer referencia a una molécula proteína terapéutica individual o a todo el grupo de proteínas terapéuticas asociadas con una molécula proteína terapéutica dada divulgada en esta columna. La columna de "actividad biológica" (columna 2) describe las actividades biológicas asociadas con la molécula proteína terapéutica. La columna 3, "Ejemplo de ensayo de actividad" proporciona referencias que describen ensayos que se pueden usar para analizar la actividad terapéutica y/o biológica de una proteína terapéutica X o una proteína de fusión de albúmina que comprende una porción de la proteína terapéutica X (o un fragmento de la misma). Cada una de las referencias citadas en la columna "Ensayo de actividad de ejemplo" se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad, en particular con respecto a la descripción del ensayo de actividad respectivo descrito en la referencia (véase la sección Procedimientos en ella, por ejemplo) para analizar la correspondiente actividad biológica expuesta en la columna "Actividad biológica" de la Tabla 1. La cuarta columna, "Indicación preferida: Y", describe enfermedades, trastornos y/o afecciones que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o mejorar mediante la proteína terapéutica X o una proteína de fusión de albúmina que comprende la porción de una proteína terapéutica X (o un fragmento de la misma). La columna "ID de la construcción" (columna 5) proporciona un enlace a un ejemplo de construcción de fusión de la albúmina divulgado en la tabla 2 que codifica una proteína de fusión de albúmina que comprende o, como alternativa, que consiste en la porción de la proteína terapéutica X (o un fragmento de la misma) de referencia.

**Tabla 1**

G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos;	Estimula la proliferación y diferenciación de las	Enfermedad de proliferación de células NFS-60 murinas (Weinstein y cols., Proc Natl Acad Sci EE.UU.	Quimioterapia; adjunta a quimioterapia; trastornos inflamatorios; cáncer, leucemia; leucemia mielocítica; neutropenia,	1642,1643, 2363, 2373, 2387,2414,2441,2702, 2637,2700,2701,2703,	Véase tabla 2, SEC ID N.º: Z para
<b>Proteína terapéutica: X</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Ejemplo de ensayo de actividad</b>	<b>Indicación preferida: Y</b>	<b>ID de la construcción</b>	<b>Proteína terapéutica: Z</b>
Granulocina; KRN 8601; Filgrastim; Lenograstim; Meograstim; Nartograstim; Neupogen; NOPIA; Gran; GRANOCYTE; Granulocina; Neutrogin; Neu-up; Neutromax)	células progenitoras de granulocitos y monocitos-macrófagos.	1986; 83, páginas 5010-4).	neutropenias primarias (por ejemplo; síndrome Kostmann); neutropenia secundaria; prevención de neutropenia; prevención y tratamiento de neutropenia en pacientes infectados con el VIH; prevención y tratamiento de neutropenia asociada con quimioterapia; infecciones asociadas con neutropenias; mielodisplasia; trastornos autoinmunes; soriasis; movilización de células progenitoras hematopoyéticas; curación de heridas; enfermedad autoinmune; trasplantes; trasplantes de médula ósea; leucemia mielógena aguda; linfoma, linfoma no hodgkiniano; leucemia linfoblástica aguda; enfermedad de Hodgkin; recuperación mieloide acelerada; enfermedad de almacenamiento de glucógeno.	2886, 2887, 2888, 2889, 2890,	construcción particular

**Tabla 2**

N.º de fusión	ID de construcción	Nombre de construcción	Descripción	Vector expresión	SEC ID N.º: Y	SEC ID N.º: X	SEC ID N.º: Z	SEC ID N.º: A	SEC ID N.º: B	Secuencia líder
10	1643	pSAC35:HSA.GCSF.T3 1-P204	GCSF maduro clonado corriente abajo de la secuencia de la HSA madura y de la secuencia líder HSA/kex2.	pSAC35	226	10	442	667	668	HSA/kex2



- La tabla 2 proporciona el polinucleótido de la invención que comprende o, como alternativa que consiste en, moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión de albúmina. La primera columna, "N° de fusión" da un número de fusión al polinucleótido. La columna 2, "ID de la construcción" proporciona un identificador numérico único para el polinucleótido de la invención. Las ID de las construcciones se pueden usar para identificar el polinucleótido que codifican proteínas de fusión de albúmina que comprenden o, como alternativa que consisten en, una porción de la proteína terapéutica correspondiente a la proteína terapéutica: X indicada en la fila correspondiente de la tabla 1, en la que dicha ID de construcción se indica en la columna 5. La columna "Nombre de la construcción" (columna 3) proporciona el nombre de una construcción o polinucleótido de fusión de albúmina dada.
- La cuarta columna de la tabla 2, "Descripción", proporciona una descripción general de una construcción de fusión de albúmina y la quinta columna, "Vector de expresión", indica el vector en el cual se clonó un polinucleótido que comprende o, como alternativa que consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina dada. En la técnica se conocen vectores y están disponibles comercialmente o se describen en otros lugares. Por ejemplo, como se describe en los Ejemplos, un "casete de expresión" que comprende o, como alternativa que consiste en, uno o más de (1) un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina dada, (2) una secuencia líder, (3) una región promotora y (4) un terminador de la transcripción, se puede ensamblar en un vector de clonación conveniente y después, pasarse a un vector de expresión de mamífero. En una realización, para expresión en *S. cerevisiae*, un casete de expresión que comprende, o alternativamente que consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina se clona en pSAC35. En otra realización, para expresión en células CHO, un casete de expresión comprende, o alternativamente consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina se clona en pC4. En una realización adicional, un polinucleótido que comprende o alternativamente que consiste en una molécula de ácido nucleico que codifica la parte de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina se clona en pC4:HSA. En una realización aún adicional, para expresión en células NS0, un casete de expresión que comprende, o alternativamente que consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de albúmina se clona en pEE12. Otros vectores de clonación y/o de expresión útiles se conocerán por el experto en la materia y están dentro del ámbito de la invención.
- La columna 6, "SEC ID N° Y", proporciona la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína de fusión de albúmina de la invención. En la mayoría de los casos, la SEC ID N° Y muestra la forma no procesada de la proteína de fusión de albúmina codificada, en otras palabras la SEC ID N° Y muestra la secuencia señal, en la porción de HSA y una porción terapéutica, todo ello codificado por la construcción concreta. Específicamente contemplado en la presente invención están todos los polinucleótidos que codifican la SEC ID N° Y. Cuando estos polinucleótidos se usan para expresar la proteína codificada de una célula, la secreción natural de la célula y las etapas de procesamiento producen una proteína que carece de la secuencia señal indicada en las columnas 4 y/u 11 de la tabla 2. La secuencia de aminoácidos específica de la secuencia señal indicada se muestra más adelante en la memoria o es bien conocida en la técnica. Por tanto, la mayoría de las realizaciones preferidas de la presente invención incluye la proteína de fusión de albúmina producida por una célula (que carecería de la secuencia líder mostrada en las columnas 4 y/u 11 de la tabla 2). Asimismo, los más preferidos son polipéptidos que comprenden la SEC ID N° Y sin la secuencia líder específica indicada en las columnas 4 y/u 11 de la tabla 2. También se divulgan las composiciones que comprenden estas dos realizaciones preferidas, incluyendo las composiciones farmacéuticas.
- La séptima columna, "SEC ID N° X", proporciona la secuencia de ácido nucleico parental a partir de la cual se puede derivar un polinucleótido que codifica una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina dada. En una realización, la secuencia de ácido nucleico parental a partir de la cual se puede derivar un polinucleótido que codifica una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina comprende la secuencia génica silvestre que codifica una proteína terapéutica que se muestra en la tabla 1.
- La octava columna, "SEC ID N° Z", proporciona una traducción predicha de la secuencia de ácido nucleico parental (SEC ID N° X). Esta secuencia parental es una proteína parental de longitud completa usada para derivar la construcción concreta. Un experto en la técnica puede usar esta secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° Z para determinar qué residuos de aminoácidos de una proteína de fusión de albúmina codificada por una construcción dada se proporcionan mediante la proteína terapéutica. Además, está dentro de la capacidad del experto en la técnica usar la secuencia mostrada como SEC ID N° Z para derivar la construcción descrita en la misma fila. Por ejemplo, si la SEC ID N° Z corresponde a una proteína de longitud completa, pero solo una porción de dicha proteína se usa para generar la CID específica, está dentro de la experiencia en la técnica usar técnicas de biología molecular, tales como PCR, para amplificar el fragmento específico y clonarlo en el vector adecuado.
- Los cebadores para amplificación proporcionados en las columnas 9 y 10, "SEC ID N° A" y "SEC ID N° B", respectivamente, son ejemplos de cebadores usados para generar un polinucleótido que comprende o, como alternativa que consiste en, una molécula de ácido nucleico que codifica la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina dada. Los cebadores oligonucleotídicos que tienen las secuencias mostradas en las columnas 9 y/o 10 (SEC ID N° A y/o B) se pueden usar para amplificar mediante PCR un polinucleótido que codifica la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina usando una molécula de ácido nucleico que comprende o, como alternativa que consiste en, la secuencia de nucleótidos proporcionada en la columna 7 (SEC ID N° X) de la correspondiente fila como molde de ADN. Los procedimientos de PCR están bien establecidos

en la técnica. Los expertos en la técnica podrían prever fácilmente las secuencias de cebadores útiles adicionales.

Los cebadores oligonucleotídicos pueden usarse en reacciones de PCR solapantes para generar mutaciones dentro de una secuencia de ADN molde. En la técnica se conocen procedimientos de PCR.

5 Como se muestra en la tabla 3, la construcción de fusión de albúmina de la invención se ha depositado en la ATCC®.

**Tabla 3**

ID de la construcción	Nombre de la construcción	Nº de depósito en la ATCC/Fecha
1643	pSAC35:HSA.GCSF.T31-P204	PTA-3766 5 Oct., 2001

10 Es posible recuperar una construcción de fusión de albúmina dada del depósito mediante técnicas conocidas en la técnica y se describen en otros lugares del presente documento (véase el ejemplo 40). La ATCC se encuentra en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 201102209, EE.UU. Los depósitos en la ATCC se han hecho bajo los términos del Tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimiento de patente.

15 En una realización adicional de la invención un “casete de expresión” que comprende o, como alternativa que consiste en, uno o más de (1) un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina dada, (2) una secuencia líder, (3) una región promotora y (4) un terminador de la transcripción se puede mover o “subclonar” de un vector a otro. Los fragmentos que se van a subclonar se pueden generar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, amplificación por PCR (p. ej., usando cebadores oligonucleotídicos que tienen la secuencia mostrada en la SEC ID N° A o B) y/o digestión mediante enzimas de restricción.

20 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención son capaces de una actividad terapéutica y/o actividad biológica correspondiente a la actividad terapéutica y/o actividad biológica de la proteína terapéutica correspondiente a la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina enumerada en la fila correspondiente de la Tabla 1.

#### **Actividad funcional**

25 “Un polipéptido que tiene actividad funcional” hace referencia a un polipéptido capaz de mostrar una o más actividades funcionales conocidas asociadas con la proproteína de longitud completa y/o forma madura de una proteína terapéutica. Dichas actividades funcionales incluyen, entre otros, la actividad biológica, la antigenicidad [capacidad para unirse (o competir con un polipéptido por la unión) a un anticuerpo anti-polipéptido], la inmunogenicidad (capacidad para generar anticuerpos que se unen a un polipéptido específico de la invención), la capacidad para formar multímeros con polipéptidos de la invención y la capacidad para unirse a un receptor o ligando por un polipéptido.

30 “Un polipéptido que tiene actividad biológica” hace referencia a un polipéptido que exhibe actividad similar, aunque no necesariamente idéntica, a una actividad de una proteína terapéutica de la presente invención, como se mide en un ensayo biológico concreto, con o sin dependencia de la dosis. En el caso de en el que exista dependencia de la dosis, no tiene que ser idéntica a la del polipéptido, sino sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con el polipéptido de la presente invención (es decir, el polipéptido candidato exhibirá mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y preferentemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad y más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad con respecto al polipéptido de la presente invención).

40 Una proteína de fusión de albúmina de la invención tiene al menos una actividad biológica y/o terapéutica asociada con la porción de proteína terapéutica cuando no está fusionada a albúmina.

45 Se puede analizar la actividad funcional (p. ej., la actividad biológica) de las proteínas de fusión de albúmina usando o modificando de forma rutinaria los ensayos conocidos en la técnica, así como ensayos descritos en el presente documento. Adicionalmente, un experto en la técnica puede analizar de forma rutinaria la actividad de fragmentos de una proteína terapéutica correspondiente a la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina usando ensayos a los que se hace referencia en su correspondiente fila de la tabla 1 (p. ej., en la columna 3 de la tabla 1). Adicionalmente, un experto en la técnica puede analizar de forma rutinaria la actividad de fragmentos de una proteína de albúmina correspondiente a la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina usando ensayos conocidos en la técnica y/o como se ha descrito en la sección Ejemplos más adelante.

50 Por ejemplo, cuando se analiza la capacidad de una proteína de fusión de albúmina para unirse o competir con una proteína terapéutica por la unión a un anticuerpo anti-polipéptido terapéutico y/o a un anticuerpo anti-albúmina se

5 pueden usar varios inmunoensayos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ (usando, por ejemplo, oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos), transferencias de tipo western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (p. ej., ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis etc. En una realización de la divulgación, la unión del anticuerpo se puede detectar detectando un marcador sobre el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se puede detectar detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo frente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario puede estar marcado. En la técnica se conocen muchos medios para detectar la unión en un inmunoensayo.

15 Cuando se identifica una pareja de unión (p. ej., un receptor o un ligando) de una proteína terapéutica, se puede analizar la unión a dicha pareja de unión mediante una proteína de fusión de albúmina que comprende dicha proteína terapéutica como porción de proteína terapéutica por medio de, por ejemplo, medios bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía en gel reductora o no reductora, cromatografía de afinidad por proteínas y transferencia de afinidad. Véase, en general, Phizicky et al., *Microbiol. Rev.* 59:94123 (1995). En otra realización, la capacidad de la correlación fisiológica de una proteína de fusión de albúmina para unirse a uno o más sustratos del polipéptido terapéutico correspondiente a la porción de proteína terapéutica de la fusión se puede analizar de forma rutinaria usando técnicas conocidas en la técnica.

20 Cuando se está evaluando la capacidad de la proteína de fusión de albúmina, se puede analizar la asociación con otros componentes del multímero, por ejemplo por medios conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía en gel reductora o no reductora, cromatografía por afinidad de proteínas y transferencia de afinidad. Véase, generalmente, Phizicky et al., *ant.*

25 Los inmunoensayos que se pueden usar para analizar la unión (inmuno-específica) y la reactividad cruzada incluyen, entre otros, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas tales como transferencias de tipo western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por citar algunas. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Ejemplos de inmunoensayos se describen brevemente más adelante (pero no se pretende que sean limitantes).

35 Generalmente, los protocolos de inmunoprecipitación comprenden lisar una población de células en un tampón de lisis, tal como tampón RIPA (1 % de NP-40 o Triton X-100, 1 % de desoxicolato sódico, 0,1 % de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato sódico 0,01 M a pH 7,2, 1 % de Trasylol) suplementado con fosfatasa proteica y/o inhibidores de la proteasa (p. ej., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato sódico), añadir la proteína de fusión de albúmina de la invención (p. ej., que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína terapéutica) al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (p. ej., de 1 a 4 horas) a 40 °C, añadir perlas de sefarosa acopladas a un anticuerpo anti-albúmina, por ejemplo, al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 40 °C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en tampón de SDS/muestra. La capacidad de la proteína de fusión de albúmina para inmunoprecipitar un antígeno concreto se puede evaluar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia de tipo western. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la unión de la proteína de fusión de albúmina a un antígeno y disminuir el fondo (p. ej., aclarar previamente el lisado celular con perlas de sefarosa). Para una discusión adicional sobre los protocolos de inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York en 10.16.1.

40 El análisis de transferencia de tipo Western generalmente comprende preparar muestras de proteínas, electroforesis de las muestras de proteínas en un gel de poli-acrilamida (p. ej., 8 % - 20 % de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra proteica desde el gel de poli-acrilamida a una membrana, tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (p. ej., PBS con 3 % de BSA o leche desgrasada), lavar la membrana en tampón de lavado (p. ej., PBS-Tween 20), aplicar la proteína de fusión de albúmina de la invención (diluida en tampón de bloqueo) a la membrana, lavar la membrana en tampón de lavado, aplicar un anticuerpo secundario (que reconoce la proteína de fusión de albúmina, por ejemplo anticuerpo anti-seroalbúmina humana) conjugado con un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radioactiva (p. ej., <sup>32</sup>P o <sup>125</sup>I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional sobre los protocolos de transferencia de tipo western, véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York en 10.8.1.

60 Los ELISA comprenden preparar el antígeno, revestir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, eliminar mediante lavado el antígeno que no se ha unido a los pocillos, añadir la proteína de fusión de

albúmina (p. ej., que comprende al menos un fragmento o variante de un anticuerpo que se une a una proteína terapéutica) de la invención conjugada a un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) a los pocillos e incubar durante un periodo de tiempo, eliminar mediante lavado las proteínas de fusión de albúmina no unidas o unidas de forma inespecífica y detectar la presencia de las proteínas de fusión de albúmina. En los ELISA, la proteína de fusión de albúmina no tiene que estar conjugado con un compuesto detectable; en su lugar, se puede añadir al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce la proteína de fusión de albúmina) conjugado a un compuesto detectable. Adicionalmente, en lugar de revestir el pocillo con el antígeno, se puede revestir el pocillo con la proteína de fusión de albúmina. En este caso, la molécula detectable podría ser el antígeno conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (p. ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina). Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional sobre los ELISA, véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

La afinidad de unión de una proteína de fusión de albúmina a una proteína, antígeno o epítipo y la tasa de disociación de una interacción proteína de fusión de albúmina – antígeno/epítipo se puede determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígenos marcados (p. ej.,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ) con la proteína de fusión de albúmina de la invención en presencia de cantidades crecientes de antígeno sin marcar y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad de la proteína de fusión de albúmina por una proteína, antígeno o epítipo específico y las tasas de disociación de la unión se pueden determinar a partir de los datos obtenidos mediante análisis del gráfico del trazado. La competición con una segunda proteína que se une a la misma proteína, antígeno o epítipo como la proteína de fusión de albúmina también se puede determinar usando radioinmunoensayos. En este caso, la proteína, antígeno o epítipo se incuba con una proteína de fusión de albúmina conjugada con un compuesto marcado (p. ej.,  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$ ) en presencia de cantidades crecientes de una segunda proteína sin marcar que se une a la misma proteína, antígeno o epítipo como la proteína de fusión de albúmina de la invención.

Se puede usar el análisis cinético BIACORE para determinar la unión y las tasas de disociación de las proteínas de fusión de albúmina de la invención a una proteína, antígeno o epítipo. El análisis cinético BIACORE™ comprende analizar la unión y la disociación de las proteínas de fusión de albúmina o polipéptidos, antígenos o epítipos específicos de los chips con polipéptidos, antígenos o epítipos o proteínas de fusión de albúmina específicos inmovilizados, respectivamente, sobre su superficie.

### **Albúmina**

Como se ha descrito anteriormente, una proteína de fusión de albúmina de la invención una proteína terapéutica y seroalbúmina humana, que se asocian entre sí, preferentemente mediante fusión genética.

Los términos seroalbúmina humana (HSA) y albúmina humana (HA) se usan en el presente documento de forma intercambiable. Los términos “albúmina” y “seroalbúmina” son más amplios y abarcan la seroalbúmina humana.

Como se usa en el presente documento, “albúmina” hace referencia en conjunto a la proteína albúmina o a la secuencia de aminoácidos que tienen una o más actividades funcionales (p. ej., actividades biológicas) de albúmina. En concreto, “albúmina” hace referencia a albúmina humana (véase, por ejemplo, los documentos EP 201 239, EP 322 094 WO 97/24445, WO95/23857), especialmente la forma madura de la albúmina humana como se muestra en la Figura 1 y la SEC ID N° 1038.

Como se usa en el presente documento, una porción de albúmina suficiente para prolongar la actividad terapéutica o la semivida de la proteína terapéutica hace referencia a una porción de albúmina de suficiente longitud o estructura para estabilizar o prolongar la actividad terapéutica de la proteína de modo que la semivida de la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina se prolonga o se extiende en comparación con la semivida en estado de no fusión. La porción de albúmina de las proteínas de fusión de albúmina comprende la longitud completa de la secuencia de HA como se ha descrito anteriormente.

### **Administración y composición terapéutica/profiláctica**

En el presente documento también se describen procedimientos de tratamiento, inhibición y profilaxis mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de la invención. El compuesto está sustancialmente purificado (p. ej. sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). Preferentemente, el sujeto es un animal, incluyendo, entre otros, animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros etc. y preferentemente, es un mamífero y más preferentemente, un ser humano.

Anteriormente se han descrito formulaciones y procedimientos de administración que se pueden usar cuando el compuesto comprende un ácido nucleico, formulaciones y vías de administración adecuadas adicionales se pueden seleccionar de entre las descritas en el presente documento más adelante.

Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar un compuesto de la invención, por

ejemplo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:44294432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector etc. Los procedimientos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica u oral. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo fijado a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear mediante, por ejemplo, el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con un agente formador de aerosoles.

Puede ser deseable administrar los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesite dicho tratamiento, esto se puede conseguir mediante, por ejemplo y sin limitaciones, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialísticas o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína se deben tomar precauciones para usar materiales que no absorban la proteína.

El compuesto o la composición se pueden liberar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249:15271533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pág. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pág. 317327; véase, en general, *ibid.*)

El compuesto o composición se puede liberar en un sistema de liberación controlada. Se puede usar una bomba (véase, Langer, *ant.*; Sefton. CRC Crit. Ref. Biomed Eng. 14:201 (1987); Buchwald y col., Surgery 88:507 (1980); Saudek y col., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). Se pueden usar materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); see also Levy et al., Science 228:190 (1985); Doring et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J.Neurosurg. 71:105 (1989)). Un sistema de liberación controlada se puede colocar cerca de la diana terapéutica, es decir el cerebro, de modo que solo se requiera una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol 2, pág.115 - 138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se tratan en la recapitulación de Langer (Science 249:15271533 (1990)).

En una realización específica en la que el compuesto de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico se puede administrar in vivo para estimular la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrarla de modo que pase a ser intracelular, por ejemplo mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente de EE.UU. nº 4.980.286) o mediante inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revistiendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante administración en unión con un péptido similar a la homeocaja que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:18641868 (1991)), etc. Como alternativa, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula huésped para expresión mediante recombinación homóloga.

En el presente documento también se divulgan composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la terapéutica. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Un vehículo preferido es agua, cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como vehículos líquidos se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos, tales

como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, a menudo en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

La composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el punto de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria como, por ejemplo, polvo liofilizado seco o concentrado sin agua, en un envase sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con un bote de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Los compuestos de la invención se pueden formular como formas salinas o neutras. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico etc. y las formadas con cationes, tales como los que derivan de sodio, potasio, amoníaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína etc.

La cantidad del compuesto de la invención que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante y/o actividad de una proteína terapéutica se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo con modelos animales o *in vitro*.

### **Proteínas de fusión de la albúmina**

La presente invención se refiere en general a proteínas de fusión de albúmina y a su uso en el tratamiento, prevención o mejora de las enfermedades o trastornos. Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión de albúmina" se refiere a una proteína formada por la fusión de una molécula de albúmina a una molécula de una proteína terapéutica. Una proteína de fusión de albúmina de la invención comprende al menos una proteína terapéutica y al menos seroalbúmina humana, que se asocian entre sí mediante fusión genética (es decir, la proteína de fusión de albúmina se genera mediante traducción de un ácido nucleico en el que un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica está unido en el marco con un polinucleótido que la albúmina) o entre sí. La proteína terapéutica y la proteína albúmina, una vez parte de la proteína de fusión de albúmina, puede, cada uno, denominarse "porción", "región" o "resto" de la proteína de fusión de albúmina.

La invención proporciona una proteína de fusión de albúmina codificada por un polinucleótido o construcción de fusión de albúmina descrita en la tabla 1 o la tabla 2. Los polinucleótidos que codifican estas proteínas de fusión de albúmina también entran en la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina son proteínas de fusión de albúmina codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprende o, como alternativa, que consiste en, un polinucleótido que codifica una molécula de albúmina unida en el marco a un polinucleótido que codifica una molécula de una proteína terapéutica, una molécula de ácido nucleico que comprende, o, como alternativa, que consiste en, un polinucleótido que codifica una molécula de albúmina unida en el marco a un polinucleótido que codifica una molécula de una proteína terapéutica generada como se describe en la Tabla 1 o la Tabla 2 o en los Ejemplos; o una molécula de ácido nucleico que comprende, o, como alternativa, que consiste en, un polinucleótido que codifica una molécula de albúmina unida en el marco a un polinucleótido que codifica una molécula de una proteína terapéutica que comprende además, por ejemplo, uno o más de los elementos siguientes: (1) un vector de autorreplicación funcional (incluido, entre otros, un vector lanzadera, un vector de expresión, un vector de integración y/o un sistema de replicación), (2) una región para el inicio de la transcripción (p. ej., una región promotora, tal como, por ejemplo, un promotor regulable o inducible, un promotor constitutivo), (3) una región para la terminación de la transcripción, (4) una secuencia líder y (5) un marcador seleccionable.

En una realización, la invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende, o, como alternativa, que consiste en, una proteína terapéutica (p. ej., como se describe en la Tabla 1) y una proteína seroalbúmina. El componente de proteína seroalbúmina de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la seroalbúmina. La porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es la porción madura de la proteína terapéutica. La invención proporciona una proteína de fusión de albúmina que comprende o, como alternativa, que consiste en, la porción madura de la proteína terapéutica y la porción madura de la seroalbúmina

La proteína de fusión de albúmina comprende HA como la porción en el extremo N y una proteína terapéutica como la porción en el extremo C. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención que comprenden una proteína terapéutica tienen una semivida prolongada en comparación con la semivida de la misma proteína terapéutica cuando no está fusionada con la albúmina. Normalmente, semivida se refiere al periodo de tiempo durante el cual la actividad terapéutica de una proteína terapéutica en solución o en alguna otra formulación de conservación es estable sin una pérdida indebida de actividad terapéutica. Muchas de las proteínas terapéuticas son muy lábiles en su estado sin fusionar. Como se ha descrito más adelante, la semivida típica de estas proteínas terapéuticas es marcadamente prolongada tras la incorporación en la proteína de fusión de albúmina de la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención con una semivida "prolongada" o "extendida" exhiben mayor actividad terapéutica con respecto a un patrón que se ha sometido a las mismas condiciones de almacenamiento y de manipulación. El patrón puede ser la proteína terapéutica de longitud completa sin fusionar. Cuando la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina es un análogo, una variante o, por otro lado, está alterada o no incluye la secuencia completa para dicha proteína, la prolongación de la actividad terapéutica puede compararse, como alternativa, con el equivalente sin fusionar de dicho análogo, variante, péptido alterado o secuencia incompleta. Como ejemplo, una proteína de fusión de albúmina de la invención puede conservar más de aproximadamente 100 % de la actividad terapéutica o más de aproximadamente 105 %, 110 %, 120 %, 130 %, 150 % o 200 % de la actividad terapéutica de un patrón cuando se somete a las mismas condiciones de almacenamiento y de manipulación que el patrón cuando se comparan en un punto de tiempo dado.

La semivida también se puede evaluar en términos de actividad terapéutica restante después del almacenamiento normalizada con respecto a la actividad terapéutica cuando comenzó el almacenamiento. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención con semivida prolongada o extendida exhibida mediante una actividad terapéutica prolongada o extendida pueden conservar más de aproximadamente el 50 % de la actividad terapéutica, aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 % o 90 % o más de la actividad terapéutica de la proteína terapéutica no fusionada equivalente cuando se somete a las mismas condiciones. Por ejemplo, como se ha tratado en el ejemplo 38, una proteína de fusión de albúmina de la invención que comprenden la hGH fusionada con la secuencia de HA de longitud completa puede conservar aproximadamente el 80 % o más de su actividad original en solución durante periodos de hasta 5 semanas o más en varias condiciones de temperatura.

### **Expresión de proteínas de fusión**

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden producir como moléculas recombinantes mediante secreción en una línea celular humana o animal. Preferentemente, el polipéptido es secretado por las células huésped.

Un aspecto particular de la invención comprende una construcción de ADN que codifica una secuencia efectiva para dirigir la secreción en levadura, en particular una secuencia señal derivada de levadura (especialmente una que es homóloga a la levadura huésped) y la molécula condensada del primer aspecto de la invención, no habiendo pro-secuencia derivada de levaduras entre la señal y el polipéptido maduro.

Los conjugados del tipo preparado por Poznansky et al., (FEBS Lett. 239:18 (1988)), en los que no se contemplan los polipéptidos preparados por separado están unidos por sobrecruzamiento químico.

La presente invención también incluye una célula de mamífero transformada para expresar una proteína de fusión de albúmina de la invención. Además de las propias células huésped transformadas, la presente invención también contempla un cultivo de dichas células, preferentemente un cultivo monoclonal (clonalmente homogéneo) o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente. Si se secreta el polipéptido, el medio contendrá el polipéptido, con las células o sin las células, si se han eliminado por filtración o centrifugación. Se conocen y se pueden usar muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*, hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insectos.

Las cepas de levaduras preferidas para su uso en la producción de proteínas de fusión de albúmina son D88, DXY1 y BXP10. D88 [*leu2-3*, *leu2-122*, *can1*, *pra1*, *ubc4*] es un derivado de la cepa parental *AH22his<sup>+</sup>* (también conocida como DB1; véase, por ejemplo, Sleep et al. Biotechnology 8:42-46 (1990)). La cepa contiene una mutación en *leu2* que permite selección auxotrófica de plásmidos basados en 2 micrómetros que contienen el gen LEU2. D88 también presenta una desrepresión de PRB1 en exceso de glucosa. El promotor PRB1 está controlado normalmente por dos puntos de control que monitorizan los niveles de glucosa y la fase de crecimiento. El promotor se activa en levaduras de tipo silvestre tras depleción de glucosa y entra en fase estacionaria. La cepa D88 presenta la depresión por glucosa pero mantiene la inducción tras entrar en fase estacionaria. El gen PRA1 codifica una proteasa vacuolar de levadura, endoproteasa A YscA, que está localizada en el retículo endoplásmico. El gen UBC4 está en la ruta de ubiquitinación y está implicada en marcar proteínas de vida corta y anormales para degradación dependiente de ubiquitina. Se encontró que el aislamiento de esta mutación de *ubc4* incrementa el número de copias de un plásmido de expresión en la célula y causa un nivel incrementado de expresión de una proteína deseada expresada a partir del plásmido (véase, por ejemplo, Publicación Internacional Número WO99/00504).

DXY1, un derivado de D88, tiene el siguiente genotipo: [*leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3::yap3*]. Además de las mutaciones aisladas en D88, esta cepa tiene también una inactivación de la proteasa YAP3. Esta proteasa causa escisión de sobre todo residuos dibásicos (RR, RK, KR, KK) pero puede promover también escisión en residuos básicos individuales en proteínas. El aislamiento de esta mutación de *yap3* dio como resultado niveles más altos de producción de HSA de longitud completa (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N.º. 5.965.386 y Kerry-Williams et al., *Yeast* 14:161-169 (1998)).

BXP10 tiene el siguiente genotipo: *leu2-3, leu2-122, can1, pra1, ubc4, ura3, yap3::URA3, lys2, hsp150::LYS2, pmt1::URA3*. Además de las mutaciones aisladas en DX1, esta cepa también tiene una inactivación del gen PMT1 y el gen HSP150. El gen PMT1 es un miembro de la familia conservada evolutivamente de las dolcil-fosfato-D-manosa proteína O-manosiltransferasas (Pmt). La topología transmembrana de de Pmt1p sugiere que esa es una proteína de membrana integral del retículo endoplásmico con un papel de glucosilación O-enlazada. Esta mutación sirve para reducir/eliminar la glucosilación O-enlazada de fusiones de HSA (véase, por ejemplo, Publicación Internacional Número WO00/44772). Estudios revelaron que la proteína Hsp150 se separa ineficazmente de rHA por cromatografía de intercambio iónico. La mutación en el gen HSP150 retira un contaminante potencial que ha demostrado dificultad para retirarse por técnicas de purificación estándar tiene dificultad demostrada para retirarse por técnicas de purificación estándar. Véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N.º. 5.783.423.

La proteína deseada se produce de formas convencionales, por ejemplo a partir de una secuencia de codificación insertada en el cromosoma del huésped o en un plásmido libre. Las levaduras se transforman con una secuencia de codificación para la proteína deseada en cualquiera de las maneras deseadas, por ejemplo electroporación. Los procedimientos para transformación de levadura por electroporación se divulgan en Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194,182.

Las células transformadas con éxito, es decir las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, las células resultantes de la introducción de una construcción de expresión se pueden cultivar para producir el polipéptido deseado. Las células se pueden recoger y lisar y analizar su contenido en ADN determinar la presencia del ADN usando un procedimiento como el descrito por Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 o Berent et al. (1985) *Biotech.* 3, 208. Como alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante se puede detectar usando anticuerpos.

Los vectores de plásmidos de levaduras útiles incluyen pRS403-406 y pRS413-416 y están generalmente disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración en levaduras (*Yip*) e incorporan los marcadores seleccionables de levaduras HIS3, 7RP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómeros de levaduras (*Ycp*).

Vectores preferidos para fabricar proteínas de fusión de albúmina para expresión en levadura incluyen pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA y pC4:HSA que se describen en detalle en el ejemplo 1. La Figura 2 muestra un mapa del plásmido pPPC0005 que se puede usar como el vector de base dentro del que los polinucleótidos que codifican proteínas terapéuticas se puede clonar para formar fusiones de HA. Ello contiene un promotor de *S. cerevisiae* *PRB1* (PRB1p), una secuencia líder de fusión (FL). El ADN que codifica HA (rHA) y una secuencia terminadora de *S. cerevisiae* *ADH1*. La secuencia líder de fusión consiste en los primeros 19 aminoácidos del péptido señal de seroalbúmina bovina humana (SEC ID N.º. 1094) y los últimos cinco aminoácidos del promotor alfa 1 del factor de apareamiento (SLDKR, véase documento EP-A-387 319).

Los plásmidos, pPPC0005, pScCHSA, pScNHSA y pC4:HSA se depositaron el 11 de abril de 2001 en la Colección de Cultivos Tipo de Estados Unidos, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 y se les dieron números de acceso ATCC PTA-3278, PTA-3276, PTA-3279 y PTA-3277, respectivamente. Otro vector útil para expresar una proteína de fusión de albúmina en levadura es el vector pSAC35 que se describe en Sleep et al., *BioTechnology* 8:42 (1990).

Otro promotor de levaduras que se puede usar para expresar la proteína de fusión de albúmina es el promotor MET25. Véase, por ejemplo, Dominik Mumburg, Rolf Muller y Martin Flunk. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, n.º. 25, páginas 5767-5768. El promotor de Met25 es de 383 bases de longitud (bases -382 a -1) y los genes expresados por este promotor se conocen también como Met15, Met17 y YLR303W. Una realización preferida usa la secuencia más adelante, donde, en el extremo 5' de la secuencia más adelante, el sitio Not 1 usado en la clonación está subrayado y en el extremo 3', el codon de partida ATG está subrayado:



**GCGGCCGCCGGATGCAAGGGTTCGAATCCCTTAGCTCTCATTATTTTTTGCTTTTT**  
**CTCTTGAGGTCACATGATCGCAAATGGCAAATGGCACGTGAAGCTGTGATATT**  
**GGGGAAGTGTGGTGGTTGGCAAATGACTAATTAAGTTAGTCAAGGCGCCATCCTC**  
**ATGAAAAGTGTGTAACATAATAACCGAAGTGTGCGAAAAGGTGGCACCTTGTCCA**  
**ATTGAACACGCTCGATGAAAAAATAAGATATATATAAGGTTAAGTAAAGCGTC**  
**TGTTAGAAAGGAAGTTTTTCCTTTTTCTTGCTCTCTTGTCTTTTCATCTACTATTTT**  
**CTTCGTGTAATACAGGGTTCGTCAGATACATAGATACAATTCTATTACCCCATCC**  
**ATACAATG (SEQ ID NO: 2138)**

Se han desarrollado varios procedimientos para unir funcionalmente el ADN a los vectores mediante el extremo cohesivo complementario. Por ejemplo, se pueden añadir tiras de homopolímero complementario al segmento del ADN que se va a insertar en el ADN del vector. El vector y el segmento de ADN se unen después mediante puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinantes.

Los ligadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un procedimiento alternativo de unir el segmento de ADN a los vectores. El segmento de ADN generado mediante digestión con endonucleasas de restricción se trata con la ADN polimerasa del bacteriófago T4 o la ADN polimerasa I de *E. coli*, enzimas que eliminan los extremos monocatenarios gamma sobresalientes con sus actividades 3' 5'-exonucleolíticas y llenan los extremos en 3' rebajados con sus actividades polimerizantes.

Por tanto, la combinación de estas actividades genera segmentos de ADN con extremos romos. Después, los segmentos romos se incuban con un exceso molar grande de moléculas ligadoras en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la unión de las moléculas de ADN de extremos romos, tal como la ADN ligasa del bacteriófago T4. Por tanto, los productos de la reacción son segmentos de ADN portadores de secuencias ligadoras poliméricas en sus extremos. Después, estos segmentos de ADN se escinden con la enzima de restricción adecuada y se ligan en un vector de expresión que se ha escindido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.

Los ligadores sintéticos que contienen diversos sitios para endonucleasas de restricción están disponibles comercialmente en una serie de fuentes, incluida International Biotechnologies Inc, New Haven, CT, EE.UU.

Un modo deseable de modificar el ADN de acuerdo con la invención si se van a preparar, por ejemplo, variantes de HA, es usar la reacción en cadena de la polimerasa como divulgan Saiki et al. (1988) Science 239, 497491. En este procedimiento, el ADN que se va a amplificar enzimáticamente está flanqueado por dos cebadores oligonucleotídicos específicos que son incorporados en el ADN amplificado. Los cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción que se pueden usar para clonar en vectores de expresión usando procedimientos conocidos en la técnica.

Los géneros ejemplares de levadura contemplados para ser útiles en la práctica de la presente invención como huéspedes para expresar las proteínas de fusión de albúmina son *Pichia* (Hansenula), *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodospordium*, *Leucosporidium*, *Botryosascus*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis* y similares. Los géneros preferidos son aquellos seleccionados del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Torulaspora*. Ejemplos de *Saccharomyces* sp. son *cerevisiae*, *S. italicus* y *S. rouxii*.

Ejemplos de *Kluyveromyces* sp. son *K. fragilis*, *K. lactis* y *K. marxianus*. Una especie de *Torulaspora* adecuada es *T. delbrueckii*. Ejemplos de *Pichia* (Hansenula) sp. son *P. angusta* (anteriormente *H. polymorpha*), *P. anomala* (anteriormente *H. anomala*) y *P. pastoris*. Los procedimientos para la transformación de *S. cerevisiae* se enseñan generalmente en los documentos EP 251 744, EP 258 067 y WO 90/01063, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Especies ejemplares preferidas de *Saccharomyces* incluyen *S. cerevisiae*, *S. italicus*, *S. diastaticus* y *Zygosaccharomyces rouxii*. Especies ejemplares preferidas de *Kluyveromyces* incluyen *K. fragilis* y *K. lactis*. Especies ejemplares preferidas de *Hansenula* incluyen *H. polymorpha* (ahora *Pichia angusta*), *H. anomala* (ahora *Pichia anomala*); y *Pichia capsulata*. Especies ejemplares preferidas adicionales de *Pichia* incluyen *P. pastoris*. Especies ejemplares preferidas de *Aspergillus* incluyen *A. niger* y *A. nidulans*. Especies ejemplares preferidas de *Yarrowia* incluyen *Y. lipolytica*. Muchas especies de levaduras preferidas están disponibles de la ATCC. Por ejemplo, las siguientes especies de levaduras preferidas están disponibles de la ATCC y son útiles en la expresión de proteínas de fusión de albúmina: *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cepa teleomorfa BY4743 mutante en *yap3*

(Número de Acceso de ATCC 4022731); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cepa teleomorfa BY4743 mutante en *hsp150* (Número de Acceso de ATCC 4021266); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cepa teleomorfa BY4743 mutante en *pmt1* (Número de Acceso de ATCC 4023792); *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, teleomorfa (Número de Acceso de ATCC 20626; 44773; 44774; y 62995); *Saccharomyces diastaticus* Andrews y Gilliland ex van der Walt, teleomorfa (Número de Acceso de ATCC 62987); *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt, teleomorfa (Número de Acceso de ATCC 76492); *Pichia angusta* (Teunisson et al.) Kurtzman, teleomorfa depositada como *Hansenula polymorpha* de Morais y Maia, teleomorfa (Número de Acceso de 26012); *Aspergillus niger* van Tieghem, anamorfa (Número de Acceso 9029); *Aspergillus niger* van Tieghem, anamorfa (Número de Acceso de ATCC 16404); *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter, anamorfa (Número de Acceso de 48756); y *Yarrowia lipolytica* (Wickerham et al.) van der Walt y von Arx, teleomorfa (Número de Acceso de ATCC 201847).

Promotores adecuados para *S. cerevisiae* incluyen aquellos asociados con el gen PGKI, genes GAL1 o GAL10, CYCI, PHO5 TRPI, ADHI, ADH2, los genes para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoglucoosa isomerasa, glucocinasa, feromona del factor de apareamiento alfa, [una feromona de factor de apareamiento], el promotor de PRBI, el promotor de GUT2, el promotor de GPDI y los promotores híbridos que implican híbridos de partes de regiones reguladoras 5' con partes de regiones reguladoras 5' de otros promotores o con sitios de activación corriente arriba (por ejemplo el promotor del documento EP-A-258 067).

Promotores regulables convenientes para su uso en *Schizosaccharomyces pombe* son el promotor reprimible por tiamina del gen *nmt* como se describe por Maundrell (1990) J. Biol. Chem. 265, 10857-10864 y el promotor del gen *jbpl* reprimible por glucosa como se describe por Hoffman y Winston (1990) Genetics 124, 807-816.

Procedimientos de transformar *Pichia* para expresión de genes ajenos se enseñan en, por ejemplo, Cregg *et al.* (1993) y diversas patentes de Phillips (por ejemplo documentos US 4 857 467) y los kits de expresión de *Pichia* están comercialmente disponibles de Invitrogen BV, Leek, Holanda e Invitrogen Corp., San Diego, California. Los promotores adecuados incluyen AOX1 y AOX2. Gleeson *et al.* (1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465 incluyen información de vectores no de *Hansenula* y transformación, siendo promotores adecuados MOX1 y FMD1; mientras EP 361 991, Fleer *et al.* (1991) y otras publicaciones de Rhone-Poulenc Rorer enseñan como expresar proteínas ajenas en *Kluyveromyces* sp., un promotor adecuado que es PGKI.

La señal de terminación de la transcripción es, preferentemente, la secuencia flanqueante en 3' de un gen eucariótico que contiene señales adecuadas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Secuencias flanqueantes en 3' adecuadas pueden ser, por ejemplo, las del gen unido de forma natural a la secuencia control de la expresión usada, es decir pueden corresponder al promotor. Alternativamente, pueden ser diferentes en cuyo caso la señal de terminación del gen de ADHI de *S. cerevisiae* se prefiere.

La proteína de fusión de albúmina deseada se expresa inicialmente con una secuencia líder de secreción, que es la secuencia señal híbrida HSA/MF $\alpha$ -1 (también conocida como HSA/kex2) (por ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYSRS�DKR, SEC ID N.º: 1111)

#### **Procedimientos adicionales de la producción recombinante y sintética de las proteínas de fusión de albúmina**

La presente invención también se refiere a vectores que contienen un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, células huésped y la producción de proteínas de fusión de albúmina mediante técnicas sintéticas y recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un vector fago, un plásmido, un virus o un retrovirus. Los vectores retrovirales pueden ser competentes en la replicación o defectivos en la replicación. En el último caso, la propagación viral generalmente solo se producirá en las células huésped de complementación.

Los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para su propagación en un huésped. En general, un vector plasmídico se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato cálcico o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, se puede empaquetar *in vitro* usando una línea celular de empaquetamiento adecuada y después transducirse en las células huésped.

El inserto polinucleotídico se unirá operativamente a un promotor adecuado, tal como el promotor del fago lambda PL, los promotores *lac*, *trp*, *phoA* y *tac* de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y los promotores de las LTR retrovirales, por citar algunas. El experto en la técnica conocerá otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para el inicio y la terminación de la transcripción y en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción de codificación de los transcritos expresados por las construcciones incluirán, preferentemente, un codón de iniciación de la traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) colocado adecuadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

Como se indica, los vectores de expresión incluirán al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418, glutamina sintasa, o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos

representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (Número de Acceso de ATCC 201178)); células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como CHO, COS, NSO, 293 y células de melanoma de Bowes; y células vegetales. Se conocen en la técnica medios de cultivo apropiados y condiciones apropiadas para las células huésped descritas anteriormente.

Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores de pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Los vectores de expresión preferidos para su uso en sistemas de levaduras incluyen, pero no se limitan a pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K y PAO815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA). Otros vectores adecuados serán fácilmente patentables para el experto en la materia.

Los polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención se fusionan con secuencias señal que dirigirán la localización de una proteína de la invención a compartimentos concretos de una célula procariota o eucariota y/o dirigir la secreción de una proteína de la invención de una célula procariota o eucariota. Por ejemplo, en *E. coli*, alguien puede desear dirigir la expresión de la proteína al espacio periplásmico. Ejemplos de secuencias señal o de proteínas (o fragmentos de las mismas) a las que las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden condensarse con el fin de dirigir la expresión del polipéptido al espacio periplásmico de bacterias incluyen, pero no están limitadas a, la secuencia señal *pelB*, la secuencia señal de proteína de unión a maltosa (MBP) MBP, la secuencia señal de *ompA* la secuencia señal de la subunidad B de enterotoxina sensible al calor de *E. coli* periplásmica y la secuencia señal de fosfatasa alcalina. Varios vectores están comercialmente disponibles para la construcción de proteínas de fusión que dirigirán la localización de una proteína, tal como la serie de vectores pMAL (en particular la serie de vectores pMAL-p) disponible de New England Biolabs. Las proteínas de fusión de albúmina de polinucleótidos de la invención pueden condensarse a la secuencia señal de pectato liasa *pelB* para incrementar la eficiencia de expresión y purificación de tales polipéptidos en bacterias gram-negativas. Véanse, Patentes de los EE.UU. N.ºs 5.576.195 y 5.846.818, péptido señal que está condensado a una proteína de fusión de albúmina de la invención con el fin de dirigir su secreción en células de mamífero es una secuencia señal híbrida HSA/MF $\alpha$ -1 (también conocida como HSA/kex2) (por ejemplo, MKWVSFISLLFLFSSAYSRSLDKR, SEC ID N.º: 1111).

Los vectores que usan la glutamina sintasa (GS) o DHFR como marcadores seleccionables se pueden amplificar en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (p. ej., la línea celular del mieloma murino NSO) que son negativas para la glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden funcionar en las células que expresan glutamina sintasa (p. ej., células de ovario de hámster chino (CHO) proporcionando inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno. Un sistema de expresión de la glutamina sintasa y componentes del mismo se detallan en las publicaciones PCT: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; y WO91/06657. Adicionalmente, los vectores de expresión de glutamina sintasa se pueden obtener en Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH). La expresión y la producción de anticuerpos monoclonales usando un sistema de expresión de GS en células de mieloma murino se describe en Bebbington y col., *Bio/technology* 10:169(1992) y en *Biblia y Robinson Biotechnol. Prog.* 11:1 (1995).

La presente invención también se refiere a células huésped que contienen las construcciones de vectores descritas con anterioridad en el presente documento y adicionalmente abarca células huésped que contienen secuencias de nucleótidos de la invención que están asociadas funcionalmente con una o más regiones control heterólogas (p. ej., promotor y/o potenciador) usando técnicas conocidas en la técnica. La célula huésped también puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero (p. ej., una célula derivada de ser humano) o una célula eucariota inferior, tal como célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. Se puede escoger una cepa huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o que modifique y procese el producto génico del modo específico deseado. La expresión de ciertos promotores se puede elevar en presencia de inductores cortina; por tanto, se puede controlar la expresión del polipéptido de ingeniería genética. Además, diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación (p. ej., fosforilación, escisión) traduccional y postraduccional de proteínas. Se pueden escoger líneas celulares adecuadas para garantizar las modificaciones y procesamiento deseados de la proteína extraña expresada.

La introducción de los ácidos nucleicos y de construcciones de ácido nucleico de la invención en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección mediada por fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos. Dichos procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis y col., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986). Específicamente se contempla que los polipéptidos de la presente invención pueden de hecho expresarse en una célula huésped que carece de un vector recombinante.

- Además de abarcar las células huésped que contienen las construcciones del vector tratadas en el presente documento, también se divulgan células huésped primarias, secundarias e inmortalizadas de origen vertebrado, en particular de origen mamífero, que se han sometido a ingeniería para delecionar o reemplazar el material genético endógeno (p. ej., la secuencia de codificación correspondiente a la proteína terapéutica se puede sustituir por una
- 5 proteína de fusión de albúmina correspondiente a la proteína terapéutica) y/o incluir material genético (p. ej., se pueden incluir secuencias de polinucleótidos heterólogos tales como, por ejemplo, una proteína de fusión de albúmina de la invención correspondiente a la proteína terapéutica). El material genético asociado funcionalmente al polinucleótido endógeno puede activar, alterar y/o amplificar los polinucleótidos endógenos.
- Además, se pueden usar técnicas conocidas en la materia para asociar funcionalmente polinucleótidos heterólogos (p. ej., polinucleótidos que codifican una proteína de albúmina) y/o regiones control heterólogas (p. ej., promotor y/o
- 10 potenciador) con secuencias de polinucleótidos endógenos que codifican una proteína terapéutica mediante recombinación homóloga (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Número 5.641.670, concedida el 24 de junio de 1997; la publicación internacional número WO 96/29411, la publicación internacional número WO 94/12650; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86:8932 - 8935 (1989); y Zijlstra et al., Nature 342:435 - 438 (1989)).
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden recuperar y purificar de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos muy conocidos, que incluyen precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción de carga hidrófoba y cromatografía lectina. Más preferentemente se usa cromatografía de líquidos de alto rendimiento
- 15 ("HPLC") para purificación.
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando cromatografía de intercambio aniónico, incluyendo, entre otras, cromatografía en columnas de Q-sefarosa, sefarosa DEAE, poros HQ, poros DEAE, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q y DEAE, Fractogel Q y DEAE.
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando cromatografía de intercambio catiónico, incluyendo, entre otros, columnas de SP-sefarosa, CM sefarosa, poros HS, poros CM, Toyopearl SP, Toyonpearl CM, Resource/Source S y CM, Fractogel S y CM y sus equivalentes y comparables.
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando cromatografía de interacción hidrófoba, incluyendo, entre otras, columnas de fenilo, butilo, metilo, octilo, hexil-sefarosa, poros fenilo, butilo, metilo, octilo, hexilo, Toyopearl fenilo, butilo, metilo, octilo, hexilo Resource/Source, fenilo, butilo, metilo, octilo, hexilo, Fractogel fenilo, butilo, metilo, octilo, hexilo y sus equivalentes y comparables.
- 20 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando cromatografía de exclusión por tamaño incluyendo, entre otros, columnas de sefarosa S100, S200, S300, de resina superdex y sus equivalentes y comparables.
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando cromatografía de afinidad incluyendo, entre otros, columnas de afinidad por pigmento mimético y de afinidad por anticuerpo que son selectivos para HSA o las moléculas de "fusión diana".
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican usando uno o más procedimientos cromatográficos enumerados anteriormente. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se purifican usando una o más de las siguientes columnas de cromatografía. Columna Q sefarosa FF, columna SP Sefarosa FF, columna Q Sefarosa de alto rendimiento, columna Blue Sefarosa FF, columna Blue, columna de fenil Sefarosa FF, columna DEAE Sefarosa FF, o columna de metilo.
- 25 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden purificar usando el procedimiento descrito en la publicación internacional PCT WO 00/44772. Un experto en la técnica podría modificar fácilmente el procedimiento descrito en la misma para su uso en la purificación de las proteínas de fusión de albúmina de la invención.
- Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden recuperar de: productos de procedimientos de síntesis química y productos producidos mediante técnicas recombinantes de un huésped procarionota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamífero. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilado o pueden no estar glicosilados. Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden incluir también un residuo de metionina inicial modificado, en algunos como resultado de procedimientos mediados por el huésped. Por tanto, en la técnica se conoce bien que la metionina en el extremo N codificada por el codón de iniciación de la traducción generalmente se elimina con una eficiencia elevada de cualquier proteína tras la traducción en todas las células eucariotas. Aunque la metionina en el extremo N de la mayoría de las proteínas también se elimina con eficiencia en la mayoría de los procarionotas, para algunas proteínas este procedimiento de eliminación procarionota es ineficiente, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al que está unida covalentemente la metionina en el extremo N.
- 30 35 40 45 50 55

En una realización, la levadura *Pichia pastoris* se usa para expresar proteínas de fusión de albúmina de la invención en un sistema eucariota. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica que puede metabolizar metanol como su única fuente de carbono. Una etapa principal en la ruta de metabolización del metanol es la oxidación de metanol a formaldehído usando O<sub>2</sub>. Esta reacción está catalizada por la enzima alcohol oxidasa. Con el fin de metabolizar metanol como su única fuente de carbono, *Pichia pastoris* debe generar niveles altos de alcohol oxidasa debido, en parte, a la afinidad relativamente baja de alcohol oxidasa por O<sub>2</sub>. Consecuentemente, en un medio de crecimiento que depende de metanol como una fuente de carbono principal, la región promotora de uno de los dos genes de alcohol oxidasa (*AOX1*) está altamente activo. En presencia de metanol, la alcohol oxidasa producida a partir del gen *AOX1* comprende hasta aproximadamente 30 % de la proteína soluble total en *Pichia pastoris*. Véanse Ellis, S.B., et al., Mol. Cell. Biol. 5:1111-21 (1985); Koutz, P.J., et al., Yeast 5:167-77 (1989); Tschopp, J.F., et al., Nucl. Acids Res. 15:3859-76 (1987). Así, una secuencia codificante heteróloga, tal como, por ejemplo, un polinucleótido de la presente invención, sometido a la regulación transcripcional de todo o parte de la secuencia reguladora *AOX1* se expresa a niveles excepcionalmente altos en levadura *Pichia* cultivada en presencia de metanol.

En un ejemplo, el vector plasmídico pPIC9K se usa para expresar ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención, como se expone en el presente documento, en un sistema de levadura encoding *Pichia* esencialmente como se describe en "Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology," D.R. Higgins y J. Cregg, eds. The Humana Press, Totowa, NJ, 1998. Este vector de expresión permite expresión y secreción de un polipéptido de la invención en virtud del promotor *AOX1* fuerte unido al péptido señal secretor de *Pichia pastoris* (PHO) (es decir., líder) localizado corriente arriba de un sitio de clonación múltiple.

Muchos otros vectores se podrían usar en lugar de pPIC9K, tales como, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9, pPIC3.5, pHL-D2, pHL-S1, pPIC3.5K y PAO815, como alguien experto en la técnica apreciará fácilmente, en la medida en que la construcción de expresión propuesta proporcione señales apropiadamente localizadas para transcripción, transducción, secreción (si se desea) y similares, incluyendo un AUG en fase según se requiere.

En otra realización, la expresión de alto nivel de una secuencia de una secuencia codificante heteróloga, tal como, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, se puede lograr clonando el polinucleótido heterólogo de la invención en un vector de expresión tal como, por ejemplo, pGAPZ o pGAPZalfa y cultivar el cultivo de levaduras en ausencia de metanol.

También se divulgan proteínas de fusión de albúmina de la presente invención que se modifican de forma diferencial durante o después de la traducción mediante, por ejemplo, entre otros, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo o a otro ligando celular etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica mediante bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH<sub>4</sub>, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina etc.

Modificaciones postraduccionales adicionales incluyen, por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono unidas a O o unidas a N, procesamiento de los extremos en N-terminal o en C-terminal), unión de restos químicos a la estructura de aminoácidos, modificaciones químicas de las cadenas de hidratos de carbono unidas a O o unidas a N y adición o delección de un residuo de metionina en el extremo N como resultado de la expresión en células huésped procariontas. Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden modificar con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad, para permitir la detección y el aislamiento de la proteína.

Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina, un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acuorina y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen yodo (<sup>111</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), carbono (<sup>14</sup>C), azufre (<sup>35</sup>S), tritio (<sup>3</sup>H), indio (<sup>111</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>113m</sup>In, <sup>115m</sup>In), tecnecio (<sup>99</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc), talio (<sup>201</sup>Tl), galio (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), paladio (<sup>103</sup>Pd), molibdeno (<sup>99</sup>Mo), xenón (<sup>133</sup>Xe), flúor (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh y <sup>97</sup>Ru.

Las proteínas de fusión de albúmina pueden estar unidas a quelantes macrocíclicos que se asocian con iones radiometálicos, incluidos, entre otros, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>166</sup>Ho y <sup>153</sup>Sm, a polipéptidos. El ion radiometálico asociado con los quelantes macrocíclicos puede ser <sup>111</sup>In. El ion radiometálico asociado con el quelante macrocíclico puede ser <sup>90</sup>Y. El quelante macrocíclico puede ser ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA). Ejemplos de moléculas ligadoras útiles para conjugar DOTA con un polipéptido se conocen habitualmente en la técnica, véase, por ejemplo, DeNardo y col., Clin Cancer Res. 4(10):248390 (1998); Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4):5537 (1999); y Zimmerman et al, Nucl. Med. Biol. 26(8):94350 (1999).

Como se ha mencionado, las proteínas de fusión de albúmina se pueden modificar mediante procedimientos

naturales, tal como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o grados variables en varios sitios en un polipéptido dado. Los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de, por ejemplo, ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales postraducionales o pueden fabricarse mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 112 (1983); Seifter y col., Meth. Enzymol. 182:626646 (1990); Rattan y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:4862 (1992)).

Se pueden fusionar proteínas de fusión de albúmina a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar purificación. La secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otras, muchas de las cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., Proc. NatL Acad. Sci. EE.UU. 86:821-824 (1989), por ejemplo, hexa-histidina mantiene purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas de péptidos útiles para purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca "HA", que corresponde a un epítipo derivado de proteína de hemaglutinina de gripe (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y la marca "etiqueta".

Las proteínas de fusión de albúmina también se pueden unir a soportes sólidos que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación de polipéptidos que están unidos mediante, que se unen a o se asocian con proteínas de fusión de albúmina de la invención. Dichos soportes sólidos incluyen, entre otros, vidrio, celulosa, poliácridamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Las proteínas de fusión de albúmina, administradas solas o en combinación con factor(es) citotóxicos y/o citocina(s) se pueden usar como agente terapéutico.

Los polipéptidos de la invención se pueden recuperar y purificar a partir de síntesis química y cultivos de células recombinantes mediante procedimientos estándar, que incluyen, entre otros, precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción de carga hidrofoba y cromatografía con lectina. Más preferentemente se usa cromatografía de líquidos de alto rendimiento ("HPLC") para purificación. Se pueden emplear técnicas muy conocidas para replegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o la purificación.

La presencia y la cantidad de proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden determinar usando ELISA, un inmunoensayo bien conocido en la técnica. En un protocolo de ELISA que sería útil para detectar/cuantificar las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprende las etapas de recubrir una placa de ELISA con un anticuerpo anti-seroalbúmina humana, bloquear la placa para prevenir la unión inespecífica, lavar la placa de ELISA, añadir un anticuerpo específico anti-proteína terapéutica acoplado a un marcador detectable (como se describe en el presente documento o, por otro lado, se conoce en la técnica) y detectar la presencia del anticuerpo secundario. En una versión alternativa de este protocolo, la placa de ELISA podría estar revestida con el anticuerpo específico anti-proteína terapéutica y el reactivo secundario marcado podría ser el anticuerpo específico anti-albúmina humana.

### **Usos de los polinucleótidos**

Cada uno de los polinucleótidos identificados en el presente documento se puede usar de muchas formas como reactivos. La siguiente descripción deberá considerarse de ejemplo y usa técnicas conocidas.

Los polinucleótidos de la presente invención son útiles para producir las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Como se describe con más detalle más adelante, los polinucleótidos de la invención (que codifican proteínas de fusión de albúmina) se pueden usar en procedimientos de ADN recombinante útiles en ingeniería genética para fabricar células, líneas celulares o tejidos que expresan la proteína de fusión de albúmina codificada por los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Los polinucleótidos de la presente invención también son útiles en terapia génica. Un objetivo de la terapia génica es insertar un gen normal en un organismo que tiene un gen defectivo en un esfuerzo por corregir el defecto genético. Los polinucleótidos divulgados en la presente invención ofrecen un medio para apuntar a dichos defectos génicos de un modo muy preciso. Otro objetivo es insertar un nuevo gen que no estaba presente en el genoma del huésped, produciendo de este modo un rasgo nuevo en la célula huésped. Ejemplos no limitantes adicionales de los

procedimientos de terapia génica abarcados por la presente invención se describen más exhaustivamente en otros lugares del presente documento (véase, por ejemplo, las secciones denominadas "Terapia génica" y los ejemplos 63 y 64),

### Usos de los polipéptidos

- 5 Cada uno de los polipéptidos identificados en el presente documento se puede usar de muchas formas. La siguiente descripción deberá considerarse de ejemplo y usa técnicas conocidas.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles para proporcionar sondas inmunológicas para la identificación diferencial del o los tejidos (p. ej., ensayos de inmunohistoquímica tales como, por ejemplo, inmunoperoxidasa ABC (Hsu et al., J. Histochem. Cytochem. 29:577 - 580 (1981)) o tipo(s) de células (p. ej., ensayos inmunocitoquímicos).

Las proteínas de fusión de albúmina que se van a usar para analizar los niveles de polipéptidos en una muestra biológica usando procedimientos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976 - 985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087 - 3096 (1987)). Otros procedimientos útiles para detectar la expresión génica de las proteínas incluyen inmunoensayos, tales como ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA). Marcadores de ensayos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos tales como yodo ( $^{111}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{115\text{m}}\text{In}$ ) y tecnecio ( $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), talio ( $^{201}\text{Tl}$ ), galio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), paladio ( $^{103}\text{Pd}$ ), molibdeno ( $^{99}\text{Mo}$ ), xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ), flúor ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$  y  $^{97}\text{Ru}$ ; marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina y biotina.

Las proteínas de fusión de albúmina e la invención también se pueden detectar in vivo mediante pruebas de imagen. Los marcadores o indicadores para las pruebas de imagen in vivo incluyen los detectables mediante radiografía X, resonancia magnética nuclear (RMN) o relajación de espín de electrones (ESR). Para la radiografía X, marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no demasiado dañinos para el sujeto. Los marcadores adecuados para RMN y ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tales como deuterio, que se puede incorporar en la proteína de fusión de albúmina marcando los nutrientes dados a una línea celular que expresa la proteína de fusión de albúmina de la invención.

Una proteína de fusión de albúmina que se ha marcado con un resto de imagen detectable adecuado, tal como un radioisótopo (por ejemplo  $^{131}\text{I}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{133}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{111\text{m}}\text{In}$ ) y tecnecio ( $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), talio ( $^{201}\text{Tl}$ ), galio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), paladio ( $^{103}\text{Pd}$ ), molibdeno ( $^{99}\text{Mo}$ ), xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ), flúor ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ , una sustancia radiopaca o un material detectable mediante resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) en el mamífero en el que se va a investigar el trastorno del sistema inmunológico. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de imagen usado determinarán la cantidad del resto de imagen necesaria para producir imágenes diagnósticas. En el caso de un resto radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada normalmente variará de aproximadamente 5 a 20 milicurios de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . La proteína de fusión de albúmina marcada preferentemente se acumulará en lugares del cuerpo (p. ej., órganos, células, espacios extracelulares o matrices) en los que se localizan uno o más receptores, ligandos o sustratos (correspondientes a los de la proteína terapéutica usada para fabricar la proteína de fusión de albúmina de la invención. La obtención de imagen del tumor *in vivo* se describe en S.W. Burchiel y col., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)). Un experto en la técnica podría modificar fácilmente los protocolos descritos en el mismo para su uso con las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para la liberación específica de las proteínas de fusión de albúmina de la invención en las células administrando las proteínas de fusión de albúmina de la invención (p. ej., polipéptidos codificados por polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o anticuerpos) asociados con polipéptidos o ácidos nucleicos heterólogos. También se divulga un procedimiento para la liberación de una proteína terapéutica en la célula diana. También se divulga un procedimiento para liberar un ácido nucleico monocatenario (p. ej., antisentido o ribozimas) o ácido nucleico bicatenario (p. ej., ADN que se puede integrar en el genoma de las células o replicar episomalmente y que se puede transcribir) en la célula objetivo.

También se divulga un procedimiento para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) administrando proteínas de fusión de albúmina en asociación con toxinas o fármacos citotóxicos.

Por "toxina" se quiere decir uno o más compuestos que se unen y activan sistemas efectores citotóxicos endógenos, radioisótopos, holotoxinas, toxinas modificadas, subunidades catalíticas de toxinas o cualquier molécula o enzima que normalmente no está presente dentro o sobre la superficie de la célula que en condiciones definidas producen la muerte de la célula. Las toxinas que se pueden usar incluyen, entre otros, radioisótopos conocidos en la técnica,

compuestos tales como, por ejemplo, anticuerpos (on porciones de los mismos que contienen fijación al complemento) que se unen a un sistema efector citotóxico endógeno inherente o inducido, timidina quinasa, endonucleasas, ARNasa, toxina alfa, ricina, abrina, exotoxinas A de *Pseudomonas*, toxina diftérica, saporina, momordina, gelonina, proteína antiviral de la hierba carmín, alfa-sarcina y toxina del cólera. "Toxina" también incluye un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radioactivo, por ejemplo emisores alfa tales como, por ejemplo,  $^{213}\text{Bi}$  u otros radioisótopos, tales como, por ejemplo,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{87}\text{Sr}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{168}\text{Yb}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{113}\text{Sn}$ ,  $^{99}\text{Tm}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{180}\text{Re}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  y  $^{183}\text{Re}$ ; marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina y biotina. También se divulga un procedimiento para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) administrando polipéptidos de la invención en asociación con el radioisótopo  $^{90}\text{Y}$ . También se divulga un procedimiento para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) administrando polipéptidos de la invención en asociación con el radioisótopo  $^{111}\text{In}$ . También se divulga un procedimiento para la destrucción específica de células (p. ej., la destrucción de células tumorales) administrando polipéptidos de la invención en asociación con el radioisótopo  $^{131}\text{I}$ .

Las técnicas conocidas en la técnica se pueden aplicar a polipéptidos marcadores de la invención. Dichas técnicas incluyen, entre otras, el uso de agentes de conjugación bifuncional (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º: 5.756.065; 5.714.631; 5.696.239; 5.652.361; 5.505.931; 5.489.425; 3.435.990; 5.428.139; 5.342.604; 5.274.119; 4.994.560; y 5.808.003).

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención son útiles para diagnóstico, tratamiento, prevención y/o pronóstico de varios trastornos en mamíferos, preferentemente seres humanos. Dichos trastornos incluyen, entre otros, los descritos en la sección "Actividades biológicas" del presente documento.

También se divulga un procedimiento diagnóstico de un trastorno, que implica (a) analizar el nivel de expresión de un determinado polipéptido en células o fluidos corporales de un individuo usando una proteína de fusión de albúmina de la invención; y (b) comparar el nivel de expresión del polipéptido analizado con el nivel de expresión de un polipéptido patrón, de modo que un incremento o disminución del nivel de expresión del polipéptido analizado frente al nivel de expresión del polipéptido patrón es indicativo de un trastorno. Con respecto al cáncer, la presencia de una cantidad relativamente alta del transcrito en tejido de biopsia de un individuo puede indicar una predisposición al desarrollo de la enfermedad o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de los síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir que los profesionales sanitarios usen medidas preventivas o tratamiento agresivo precoz, de modo que se prevenga el desarrollo o la progresión posterior del cáncer.

Además, las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades o afecciones, tales como, por ejemplo, trastornos neurales, trastornos del sistema inmunológico, trastornos musculares, trastornos de la reproducción, trastornos gastrointestinales, trastornos pulmonares, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos proliferativos y/o enfermedades y afecciones cancerosas. Por ejemplo, se puede administrar a los pacientes un polipéptido de la presente invención en un esfuerzo por sustituir niveles ausentes o disminuidos de un polipéptido (p. ej., un oncogén o supresor tumoral), por activar la actividad de un polipéptido (p. ej., mediante la unión a un receptor), por reducir la actividad de un receptor unido a la membrana compitiendo con él por el ligando libre (p. ej., receptores solubles de TNF usados en la reducción de la inflamación) o por producir una respuesta deseada (p. ej., inhibición del crecimiento de vasos sanguíneos, potenciación de la respuesta inmunitaria a células en proliferación o tejidos).

Como mínimo, las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención de la presente invención se pueden usar como marcadores de peso molecular sobre geles de SDS-PAGE o sobre columnas de filtración en gel para tamiz molecular usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención también se pueden usar para producir anticuerpos que, a su vez, se pueden usar para medir la expresión de proteínas de la proteína terapéutica, proteína albúmina y/o la proteína de fusión de albúmina de la invención a partir de una célula recombinante, como modo de evaluar la transformación de la célula huésped o en una muestra biológica. Además, las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden usar para analizar las actividades biológicas descritas en el presente documento.

#### Ensayos diagnósticos

Las proteínas de fusión de albúmina divulgadas son útiles en el diagnóstico, de enfermedades inflamatorias en mamíferos, preferentemente humanos.

Para un número de trastornos, niveles sustancialmente alterados (incrementados o decrementados) de expresión génica se pueden detectar en tejidos, células o fluidos corporales (por ejemplo, sueros, plasma, orina, semen, fluido sinovial o fluido espinal) tomada a partir de un individuo que tiene un trastorno tal, relativo a un nivel de expresión génica "estándar", es decir, el nivel de expresión en tejidos o fluidos corporales de un individuo que no tiene el trastorno. Así, se divulga un procedimiento diagnóstico útil durante el diagnóstico de un trastorno, que implica medir el nivel de expresión del gen que codifica un polipéptido en tejidos, células o fluido corporal de un individuo y comparar el nivel de expresión génica medido con un nivel de expresión génica estándar, en el que un incremento o



decremento en el/los nivel(es) de expresión génica comparados con el estándar es indicativo de un trastorno. Estos ensayos diagnósticos se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*, tal como, por ejemplo, en muestras de sangre, tejido de biopsia o tejido de autopsia.

5 Este procedimiento también es útil como un indicador de pronóstico, por el que los pacientes que presentan expresión génica potenciada o deprimida experimentarán un resultado clínico peor.

10 Por "ensayar el nivel de expresión del gen que codifica un polipéptido" se desea medir o estimar cuantitativa o cualitativamente el nivel de un polipéptido particular (por ejemplo un polipéptido que corresponde a una proteína terapéutica divulgada en la tabla 1) o el nivel del ARNm que codifica el polipéptido de la invención en una primera muestra biológica bien directamente (por ejemplo, determinando o estimando nivel de proteína absoluta o nivel de ARNm) o bien relativamente (por ejemplo, comparando el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm en una segunda muestra biológica). Preferentemente, el nivel de expresión de polipéptido o el nivel de ARNm en la primera muestra biológica se mide o estima y se compara con un nivel polipeptídico o con un nivel de ARNm estándar, tomándose el estándar de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o que se determina promediando niveles de una población de individuos que no tiene el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez un nivel polipeptídico estándar o nivel de ARNm se conoce, ello se puede usar repetidamente como un estándar para comparación.

15 Por "muestra biológica" se quiere decir cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo tisular, u otra fuente que contiene polipéptidos de la invención o ARNm. Cimi se indica, las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como sueros, plasma, orina, fluido sinovial y fluido espinal) y fuentes de tejido que se encuentra que expresan la longitud total o fragmentos de la misma de un polipéptido o ARNm. Procedimientos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de mamíferos se conocen bien en la técnica. Donde la muestra biológica es para incluir ARNm, la fuente preferida es una biopsia de tejidos.

20 El ARN celular total se puede aislar a partir de una muestra biológica usando cualquier técnica adecuada tal como el procedimiento de guanidio-tiocianato-fenol-cloroformo de una etapa descrito en Chomczynski y Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987). Niveles de ARNm que codifican los polipéptidos de la invención se ensayan después usando cualquier procedimiento apropiado. Estos incluyen análisis por prueba de bandas de Northern, mapeo de nucleasas de S1, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la transcripción reversa en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la transcripción reversa en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR).

25 También se describen ensayos diagnósticos tales como ensayos cuantitativos y cualitativos para detectar niveles de polipeptidos que se unen a, están unidos por, o están asociados con proteínas de fusión de albúmina de la invención, en una muestra biológica (por ejemplo, células y tejidos), incluyendo determinación de niveles normales y anormales de polipéptidos. Así, por ejemplo, un ensayo diagnóstico para detectar expresión anormal de polipéptidos que se unen a, están unidos por, o están asociados con proteínas de fusión de albúmina comparadas con muestras de tejido control normales se pueden usar para detectar la presencia de tumores. Las técnicas de ensayo que se pueden usar para determinar niveles de un polipéptido que se unen a, están unidos por, o se asocian con proteínas de fusión de albúmina de la presente invención en una muestra derivada de un huésped se conocen bien por los expertos en la técnica. Yales procedimientos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de prueba de bandas de Western y análisis de ELISA. Someter a ensayo los niveles de polipéptido en una muestra biológica puede tener lugar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica.

30 Someter a ensayo los niveles de polipéptido en una muestra biológica puede tener lugar usando una diversidad de técnicas. Por ejemplo, la expresión de polipéptidos en tejidos se puede estudiar con procedimientos inmunohistológicos clásicos (Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros procedimientos útiles para detectar expresión de genes polipeptídicos incluyen inmunoensayos, tales como en ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Las etiquetas de ensayo de anticuerpo adecuadas se conocen en la técnica e incluyen etiquetas enzimáticas, tales como, glucosa oxidasa y radioisótopos, tales como yodo ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{112}\text{In}$ ) y tecnecio ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina y biotina.

35 El tipo de célula o de tejido a analizarse incluirá generalmente aquellos que se conoce que, o se sospecha que, expresan el gen de interés (tales como, por ejemplo, cáncer). Los procedimientos de aislamiento de proteínas empleados en el presente documento pueden, por ejemplo, ser tales como aquellos descritos en Harlow y Lane (Harlow, E. y Lane, D., 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las células aisladas se pueden derivar del cultivo celular o de un paciente. El análisis de células tomadas del cultivo puede ser una etapa necesaria en la estimación de células que podrían usarse como parte de una terapia génica basada en células o, alternativamente, para someter a ensayo el efecto de compuestos de la expresión del gen.

40 Por ejemplo, las proteínas de fusión de albúmina se pueden usar para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de polipéptidos que se unen a, o asociados con proteínas de fusión de albúmina. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, por técnicas de inmunofluorescencia empleando una proteína de fusión de albúmina etiquetada

fluorescentemente acoplada con detección por microscopía electrónica, citometría de flujo o fluorimetría.

Las proteínas de fusión de albúmina pueden, adicionalmente, emplearse histológicamente, como en ensayos de inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, para detección in situ de polipéptidos que se unen a, están unidos por, o se asocian con una proteína de fusión de albúmina. La detección in situ se puede llevar a cabo retirando un espécimen histológico de un paciente y aplicando al mismo un polipéptido. Las proteínas de fusión de albúmina se aplican preferentemente sobrecargando las proteínas de fusión de albúmina en una muestra biológica. Por el uso de un procedimiento tal, es posible determinar no solamente la presencia de los polipéptidos que se unen a, o se asocian con las proteínas de fusión de albúmina, sino también su distribución en el tejido examinado. Aquellos de habilidad normal en la técnica percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia diversidad de procedimientos histológicos (tales como procedimientos de tinción) se pueden modificar con el fin de lograr tal detección in situ.

Imunoensayos y ensayos no inmunitarios que detectan polipéptidos que se unen a, están unido por, o se asocian con proteína de fusión de albúmina comprenderán típicamente incubar una muestra, tal como un fluido biológico, un extracto tisular, células recién cosechadas o lisadas de células que se han incubado en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo marcado de forma detectable capaz de unir productos génicos o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de los mismos y de detectar el anticuerpo unido por cualquiera de un número de técnicas bien conocidas en la técnica.

La muestra biológica se puede llevar en contacto con e inmovilizar sobre un soporte de fase sólida o vehículo de fase sólida tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que es seco capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte se puede lavar después con tampones adecuados seguidos por tratamiento con la proteína de fusión de albúmina marcada detectablemente de la invención. El soporte en fase sólida se puede lavar con el tampón una segunda vez para retirar anticuerpo o polipéptido no deseado. Opcionalmente el anticuerpo está marcado subsiguientemente. La cantidad de etiqueta unida en soporte sólido se puede detectar por medios convencionales.

Por "soporte o vehículo en fase sólida" se quiere decir cualquier soporte capaz de unir un polipéptido (por ejemplo, una proteína de fusión a albúmina, o un polipéptido que une, está unido por, o está asociado con una proteína de fusión de albúmina de la invención). Soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser bien soluble en algún grado o bien insoluble para los propósitos de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible en la medida en que la molécula acoplada es capaz de unir a un polipéptido. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o en la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tura de ensayo, etc. Los soportes preferidos incluyen perlas de poliestireno. Aquellos expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno, o serán capaces de determinar los mismos por uso de experimentación de rutina.

La actividad de unión de una cantidad dada de proteína de fusión de albúmina se puede determinar de acuerdo a procedimientos bien conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación de rutina.

Además de someter a ensayo los niveles de polipéptido en una muestra biológica obtenida de un individuo, el polipéptido se puede detectar *in vivo* por formación de imágenes. Por ejemplo, en una realización de la invención, las proteínas de fusión de albúmina se usan para formar imágenes de células enfermas o neoplásicas.

Las etiquetas o marcadores para formación de imágenes *in vivo* de la invención incluyen aquellas detectables por radiografía de rayos X, RMN, MRI, escaneados de CAT o ESR. Para radiografía de rayos X, las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radioacción detectable pero no son dañinos abiertamente para el sujeto. Los marcadores adecuados para RMN y ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tal como deuterio, que puede incorporarse dentro de la proteína de fusión de albúmina por marcado de nutrientes de una línea celular (o cepa bacteriana o cepa de levadura) manipulado.

Adicionalmente, se pueden administrar proteínas de fusión de albúmina de la invención cuya presencia se puede detectar. Por ejemplo, proteínas de fusión de albúmina de la invención marcadas con un compuesto radio-opaco o con otro compuesto apropiado se pueden administrar y visualizar *in vivo*, como se discute anteriormente para anticuerpos marcados. Adicionalmente, tales polipéptidos se pueden utilizar para procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico de polipéptido que se ha marcado con un resto de formación de imágenes detectable apropiado, tal como un radioisótopo (por ejemplo,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), una sustancia radio-opaca, o un material detectable por resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, parenteralmente, subcutáneamente o intraperitonealmente) en el mamífero a examinar el busca de un trastorno. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes usado determinará la cantidad de resto de

formación de imágenes necesario para producir imágenes diagnósticas. En el caso de un resto de radioisótopos, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada variará normalmente desde aproximadamente 5 a 20 milicurios de <sup>99m</sup>Tc. La proteína de fusión de albúmina marcada se acumulará después preferentemente en las localizaciones en el cuerpo que contienen un polipéptido u otra sustancia que se une a, está unida por o está asociada con una proteína de fusión a albúmina de la presente invención. La formación de imágenes de tumores *in vivo* se describe en S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

Una de las maneras en la que la proteína de fusión a albúmina de la presente invención puede marcarse detectablemente es uniendo la misma a una enzima comunicadora y usando el producto unido en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J.E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), 1980, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL.; Ishikawa, E. et al., (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kogaku Shoin, Tokyo). La enzima comunicadora que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferentemente un sustrato cromogénico, de una manera tal como para producir un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas comunicadoras que se pueden usar para marcar de forma detectable el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de lavaduras, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la detección puede llevarse a cabo por procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima comunicadora. La detección puede llevarse a cabo también por comparación visual del grado de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de forma similar.

Las proteínas de fusión de albúmina pueden también radiomarcarse y usarse en cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiactivamente las proteínas de fusión de albúmina, es posible usar las proteínas de fusión de albúmina en un radioinmunoensayo (RIA) (véanse, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo, 1986). El isótopo radiactivo se puede detectar por medios que incluyen, pero no se limitan a, un contador gamma, un contador de centelleo, o autorradiografía.

Adicionalmente, las moléculas quelantes, se conocen en la técnica y se pueden usar para etiquetar las proteínas de fusión a albúmina. Las moléculas quelantes pueden unirse a proteínas de fusión de albúmina de la invención para facilitar etiquetar dichas proteínas con iones metálicos que incluyen radionúclidos o etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, véanse Subramanian, R. y Meares, C.F., "Bifunctional Chelating Agents for Radiometal-labeled monoclonal Antibodies," in Cancer Imaging with Radiolabeled Antibodies (D. M. Goldenberg, Ed.) Kluwer Academic Publications, Boston; Saji, H., "Targeted delivery of radiolabeled imaging and therapeutic agents: bifunctional radiopharmaceuticals." Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 16:209-244 (1999); Srivastava S.C. y Mease R.C., "Progress in research on ligands, nuclides and techniques for labeling monoclonal antibodies." Int. J. Rad. Appl. Instrum. B 18:589-603 (1991); y Liu, S. y Edwards, D.S., "Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals." Bioconjug. Chem. 12:7-34 (2001). Cualquier quelante que pueda unirse covalentemente a dichas proteínas de fusión de albúmina se puede usar de acuerdo con la presente invención. El quelante puede comprender adicionalmente un resto de engarce que conecta el resto quelante con la proteína de fusión de albúmina.

En una realización, la proteína de fusión de albúmina de la invención está unida a un quelante acíclico tal como ácido dietilentriamina-N,N,N',N',N"-pentaacético (DPTA), análogos de DPTA y derivados de DPTA. Como ejemplos no limitantes, el quelante puede ser ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-6-metildietilentriaminapentaacético (1B4M-DPTA, también conocido como MX-DTPA), ácido 2-metil-6-(rho-nitrobencil)-1,4,7-triazaheptano-N,N,N',N',N"-pentaacético (nitro-1B4M-DTPA o nitro-MX-DTPA); ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-ciclohexildietilentriaminapentaacético (CHX-DTPA), o ácido N-[2-amino-3-(rho-nitrofenil)propil]-trans-ciclohexano-1,2-diamina-N,N',N"-pentaacético (nitro-CHX-A-DTPA).

En otra realización, la proteína de fusión de albúmina de la invención está unida a un quelante de terpiridina acíclica tal como 6,6"-bis[(N,N,N',N"-tetra(carboximetil)amino)metil]-4'-(3-amino-4-metoxifenil)-2,2':6',2"-terpiridina (TMT-amina).

En realizaciones específicas, el quelante macrocíclico que está unido a la proteína de fusión de albúmina de la invención es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N,N',N"-tetraacético (DOTA). En otras realizaciones específicas, el DOTA está unido a la proteína de fusión de albúmina de la invención por medio de una molécula de engarce. Ejemplos de moléculas de engarce útiles para conjugar DOTA a un polipéptido se conocen comúnmente en la técnica -véanse, por ejemplo, DeNardo et al., Clin. Cancer Res. 4(10):2483-90, 1998; Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4):553-7, 1999; and Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, 1999. Además, las Patentes de los EE.UU. 5.652.361 y 5.756.065, que divulgan agentes quelantes que pueden estar conjugados a anticuerpos y procedimientos para fabricarlos y usarlos, se incorporan en el presente documento por referencia en

su totalidad. Aunque las Patentes de los Estados Unidos 5.652.361 y 5.756.065 se centran en agentes quelantes de conjugación a anticuerpos, alguien experto en la técnica puede adaptar fácilmente el procedimiento descrito en ellas con el fin de conjugar agentes quelantes a otros polipéptidos.

5 Quelantes bifuncionales basados en ligando macrocíclicos en los que la conjugación es por medio de un brazo activado, o grupo funcional activado, unido al armazón de carbono del ligando se pueden emplear como se describe por M. Moi et al., J. Amer. Chem. Soc. 49:2639 (1989) (ácido 2-*p*-nitrobenzil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético); S. V. Deshpande et al., J. Nucl. Med. 31:473 (1990); G. Ruser et al., Bioconj. Chem. 1:345 (1990); C. J. Broan et al., J. C. S. Chem. Comm. 23:1739 (1990); y C. J. Anderson et al., J. Nucl. Med. 36:850 (1995).

10 En una realización, un quelante macrocíclico, tal como quelantes poliazamacrocíclicos, que contienen opcionalmente uno o más grupos carboxi, amino, hidroxamato, fosfonato, o fosfato, están unidos a la proteína de fusión de albúmina de la invención. En otra realización, el quelante es un quelante seleccionado del grupo constituido por DOTA, análogos de DOTA y derivados de DOTA.

15 En una realización, las moléculas quelantes adecuadas que pueden unirse a la proteína de fusión de albúmina de la invención incluyen DOXA (ácido 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecanotriacético), NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononotriacético), TETA (ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecanotetraacético) y THT (4'-(3-amino-4-metoxi-fenil)-6,6"-bis(N',N'-dicarboximetil-N-metilhidrazino)-2,2':6',2"-terpiridina) y análogos y derivados de los mismos. Véase, por ejemplo, Ohmono et al., J. Med. Chem. 35: 157-162 (1992); Kung et al., J. Nucl. Med. 25: 326-332 (1984); Jurisson et al., Chem. Rev. 93:1137-1156 (1993); y Patente de los EE.UU. N.º: 5.367.080. Otros  
20 quelantes adecuados incluyen agentes quelantes divulgados en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 4.647.447; 4.687.659; 4.885.363; EP-A-71564; WO89/00557; y EP-A-232751.

En otra realización, quelantes de ácidos carboxílicos macrocíclicos que pueden usarse en la presente invención incluyen ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA); ácido 1,4,8,12-tetraazaciclopentadecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (15N4); ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético (9N3);  
25 ácido 1,5,9-triazaciclododecano-N,N',N''-triacético (12N3); y ácido 6-bromoacetamido-bencil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (BAT).

Un quelante preferido que puede unirse a la proteína de fusión de albúmina de la invención es ácido  $\alpha$ -(5-isotiocianato-2-metoxifenil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético, que se conoce también como MeO-DOTA-NCS. Una sal o éster de ácido  $\alpha$ -(5-isotiocianato-2-metoxifenil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético se puede usar también.  
30

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención a las que están unidos covalentemente quelantes tales como aquellos descritos se pueden etiquetar (por medio del sitio de coordinación del quelante) con radionúclidos que son adecuados para propósitos terapéuticos, diagnósticos, o tanto terapéuticos como diagnósticos. Ejemplos de metales apropiados incluyen Ag, At, Au, Bi, Cu, Ga, Ho, In, Lu, Pb, Pd, Pm, Pr, Rb, Re, Rh, Sc, Sr, Tc, Tl, Y e Yb. Ejemplos  
35 de los radionúclidos usados para propósitos diagnósticos son Fe, Gd,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ , o  $^{68}\text{Ga}$ . En otra realización, el radionúclido usado para propósitos diagnósticos es  $^{111}\text{In}$ , o  $^{67}\text{Ga}$ . Ejemplos de los radionúclidos usados para propósitos terapéuticos son  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{115\text{m}}\text{In}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ , o  $^{72}\text{Ga}$ . En una realización, el radionúclido usado para propósitos diagnósticos es  $^{166}\text{Ho}$  o  $^{90}\text{Y}$ . Ejemplos de los radionúclidos usados tanto para propósitos terapéuticos como para propósitos diagnósticos incluyen  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ , o  $^{47}\text{Sc}$ . En una realización, el radionúclido es  
40  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ , o  $^{159}\text{Gd}$ .

Los radionúclidos metálicos preferidos incluyen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{177\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{177\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{95}\text{Ru}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{203}\text{Pb}$  y  $^{141}\text{Ce}$ .

En una realización particular, las proteínas de fusión de albúmina de la invención a las que están unidos covalentemente quelantes pueden marcarse con un ion metálico seleccionado del grupo constituido por  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  
45  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{215}\text{Bi}$  y  $^{225}\text{Ac}$ .

Además, radionúclidos que emiten  $\gamma$ , tales como  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{169}\text{Yb}$  se han aprobado o están bajo investigación para formación de imágenes diagnóstica, mientras que los emisores de  $\beta$ , tales como  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{186}\text{Re}$  y  $^{90}\text{Y}$  son útiles para las aplicaciones en terapia tumoral. También otros radionúclidos útiles incluyen emisores de  $\gamma$ , tales como  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  y  $^{169}\text{Yb}$  y emisores de  $\beta$ , tales como  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  y  $^{90}\text{Y}$  así como otros radionúclidos de interés tales como  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{86}\text{Rb}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{214}\text{Pb}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  
50  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{208}\text{Tl}$  y  $^{44}\text{Sc}$ . Las proteínas de fusión de albúmina de la invención a las que están covalentemente unidos los quelantes pueden estar marcados con los radionúclidos descritos anteriormente.

En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención a las que están covalentemente unidas los quelantes pueden marcarse con iones de metales paramagnéticos que incluyen iones de transición y metal lantánido, tales como metales que tienen números atómicos de 21-29, 42, 43, 44, o 57-71, en particular iones de Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y Lu. Los metales paramagnéticos usado en composiciones para formación de imágenes de resonancia magnética incluyen los elementos que tienen números atómicos de 22 a 29, 42, 44 y 58-70.  
55

En otra realización, proteínas de fusión de albúmina de la invención a las que los quelantes están covalentemente unidas pueden estar marcadas con iones metálicos fluorescentes que incluyen lantánidos, en particular La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu (por ejemplo, <sup>152</sup>Eu), Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y Lu.

5 En otra realización, proteínas de fusión de albúmina de la invención a las que los quelantes están covalentemente unidas pueden estar marcadas con comunicadores que contienen metales pesados pueden incluir átomos de Mo, Bi, Si y W.

10 También es posible marcar las proteínas de fusión a albúmina con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente está expuesto a luz de la longitud de onda apropiada, su presencia puede detectarse después debido a fluorescencia. Entre los compuestos de marcado fluorescentes están isotiocinato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, oftaldehído y fluorescamina.

La proteína de fusión de albúmina pueden también marcarse de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como <sup>152</sup>Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes de metales como ácido dietiltri Aminapentacético (DTPA) o ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).

15 Las proteínas de fusión de albúmina pueden también marcarse detectablemente acoplándolas a un compuesto de quimioluminiscencia. La presencia de la proteína de fusión de albúmina marcada de forma quimioluminiscente se determina después detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos que marcan quimioluminiscentemente son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

20 Asimismo, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar proteínas de fusión de albúmina de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica incrementa la eficiencia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos importantes bioluminiscentes para propósitos de marcaje son luciferina, luciferasa y aecuorina.

## 25 **Actividades biológicas**

La presente invención abarca proteínas de fusión d albúmina para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno indicado en la columna "Indicación preferida Y" de la tabla 1 que comprende administrar a un paciente en el que se desea dicho tratamiento de prevención o mejora de la enfermedad o trastorno.

30 Específicamente contempladas en la presente invención están las proteínas de fusión de albúmina producidas por una célula cuando están codificadas por los polinucleótidos que codifican la SEC ID N° Y. Cuando estos polinucleótidos se usan para expresar las proteínas codificadas de una célula, la secreción natural de la célula y las etapas de procesamiento producen una proteína que carece de la secuencia señal explícitamente indicada en las columnas 4 y/u 11 de la tabla 2. La secuencia de aminoácidos específica de la secuencia señal indicada se muestra más adelante en la memoria o es bien conocida en la técnica. Por tanto, la mayoría de las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen la proteína de fusión de albúmina producida por una célula (que carecería de la secuencia líder mostrada en las columnas 4 y/u 11 de la tabla 2). También son más preferidos los polipéptidos que comprenden la SEC ID N° Y sin la secuencia líder específica indicada en las columnas 4 y/u 11 de la tabla 2. También se prefieren composiciones que comprenden estas dos realizaciones preferidas, incluyendo composiciones farmacéuticas. Estas proteínas de fusión de albúmina se contemplan específicamente para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno indicado para una proteína terapéutica concreta en la columna "Indicación preferida Y" de la tabla 1.

45 En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden usar en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos relacionados con enfermedades y trastornos del sistema endocrino (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos endocrinos" más adelante), el sistema nervioso (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos neurológicos" más adelante), el sistema inmunológico (véase, por ejemplo, la sección "Actividad inmunitaria" más adelante), sistema respiratorio (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos respiratorios" más adelante), sistema cardiovascular (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos cardiovasculares" más adelante), sistema reproductor (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos del sistema reproductor" más adelante), sistema digestivo (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos gastrointestinales" más adelante), enfermedades y/o trastornos relacionados con la proliferación celular (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos hiperproliferativos, más adelante) y/o enfermedades o trastornos relacionados con la sangre (véase, por ejemplo, la sección "Trastornos relacionados con la sangre", más adelante).

50 En ciertas realizaciones, una proteína de fusión de albúmina se puede usar para diagnosticar y/o pronosticar enfermedades y/o trastornos asociados con el o los tejidos en los que se expresa el gen correspondiente a la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de la invención.

Por tanto, las proteínas de fusión de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles en el diagnóstico, detección y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos

asociados con actividades que incluyen, entre otros, la activación de prohormonas, la actividad de neurotransmisor, la señalización celular, la proliferación celular, la diferenciación celular y la migración celular.

Más en general, las proteínas de fusión de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y/o trastornos asociados con los sistemas siguientes.

#### **Actividad inmunitaria**

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, trastornos y/o afecciones del sistema inmunitario mediante, por ejemplo, activación o inhibición de la proliferación diferenciación o movilización (quimiotaxis) de las células inmunitarias. Las células inmunitarias se desarrollan a través de un proceso denominado hematopoyesis, produciendo células mieloides (plaquetas, glóbulos rojos, neutrófilos y macrófagos) y linfoides (linfocitos B y T) a partir de células madre pluripotenciales. La etiología de estas enfermedades, trastornos y/o afecciones inmunitarias pueden ser enfermedades genéticas, somáticas, tales como cáncer y algunas enfermedades autoinmunitarias, adquiridas (p. ej., mediante quimioterapia o toxinas) o infecciosas. Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden usar como marcadores o detectores de una enfermedad o trastorno concreto del sistema inmunológico.

En otra realización, una proteína de fusión de la invención y/o el polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se puede usar para tratar enfermedades y trastornos del sistema inmunológico y/o para inhibir o potenciar una respuesta inmunitaria generada por células asociadas con el o los tejidos en los que se expresa el polipéptido de la invención.

Las proteínas de fusión de albúmina y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de inmunodeficiencias, incluidas inmunodeficiencias tanto congénitas como adquiridas. Ejemplos de inmunodeficiencias de los linfocitos B en los que los niveles de inmunoglobulinas, la función de los linfocitos B y la cifra de los linfocitos B están disminuidos incluyen: agammaglobulinemia ligada cromosoma X (enfermedad de Bruton), agammaglobulinemia infantil ligada al cromosoma X, inmunodeficiencia ligada al cromosoma X con hiper IgM, inmunodeficiencia no ligada al cromosoma X con hiper IgM, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP), agammaglobulinemia incluyendo agammaglobulinemia congénita y adquirida, agammaglobulinemia de inicio en la edad adulta, agammaglobulinemia de inicio tardío, disgammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia inespecífica, agammaglobulinemia recesiva (de tipo suizo), deficiencia selectiva de IgM, deficiencia selectiva de IgA, deficiencias selectivas de la subclase de IgG, deficiencia de la subclase de IgG (con o sin deficiencia de IgA), deficiencia de Ig con deficiencia de IgM, IgG e IgA incrementada con IgM incrementada, deficiencia de anticuerpos con Ig normales o elevadas, deleciones de la cadena pesada de Ig, deficiencia de la cadena kappa, trastorno linfoproliferativo de linfocitos B (TLPLB), inmunodeficiencia variable común (IDVC), inmunodeficiencia variable común (IVC) (adquirida) e hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia.

En realizaciones específicas, la ataxia telangiectasia o afecciones asociadas con ataxia telangiectasia se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Ejemplos de inmunodeficiencias congénitas en las que la función y/o el número de linfocitos T y/o linfocitos B está disminuido incluyen, entre otros: anomalía de DiGeorge, inmunodeficiencias combinadas graves (IDCG) (incluyendo, entre otros, IDCG ligada al cromosoma X, IDCG autonómica recesiva, deficiencia de la adenosina desaminasa, deficiencia de la nucleósido purina fosforilasa (PNP), deficiencia del MHC de clase II (SÍNDROME del linfocito desnudo), síndrome de Wiskott-Aldrich y ataxia telangiectasia), hipoplasia del timo, síndrome de la tercera y cuarta bolsa faríngea, deleción de 22q11,2, candidiasis mucocutánea crónica, deficiencia de células asesinas naturales (NK), linfocitopenia T CD4+ idiopática, inmunodeficiencia con defecto de linfocitos T predominantes (inespecífica) e inmunodeficiencia inespecífica de inmunidad celular.

En realizaciones específicas, La anomalía de DiGeorge o afecciones asociadas con la anomalía de DiGeorge se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

Otras inmunodeficiencias que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar usando proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, incluyen, entre otros, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Chédiak-Higashi, deficiencia de la mieloperoxidasa, deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de leucocitos, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (LPX), deficiencia de la adhesión de leucocitos, deficiencias del componente del complemento (incluyendo deficiencias de C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y/o C9), disgenesia reticular, alinfoplasia/aplasia tímica, inmunodeficiencia con timoma, leucopenia congénita grave, displasia con inmunodeficiencia, neutropenia neonatal, enanismo de extremidades cortas e inmunodeficiencia combinada con síndrome de Nezelof con Ig.

En una realización preferida, las inmunodeficiencias y/o afecciones asociadas con las inmunodeficiencias citadas anteriormente se tratan, presenta, diagnostican y/o pronostican usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

5 En una realización preferida, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar como agentes para reforzar la capacidad de respuesta inmunitaria entre individuos inmunodeficientes. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden usar como agentes para reforzar la capacidad de respuesta inmunitaria entre individuos inmunodeficientes de linfocitos B y/o linfocitos T.

10 Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de trastornos autoinmunitarios. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de un reconocimiento inadecuado de lo propio como material extraño por parte de las células inmunitarias. Este reconocimiento inadecuado tiene como resultado una respuesta inmunitaria que conduce a la destrucción del tejido huésped. Por tanto, la administración de proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, que pueden inhibir una respuesta inmunitaria, en particular la proliferación, diferenciación o quimiotaxis de linfocitos T, puede ser una terapia eficaz en la prevención de trastornos autoinmunitarios.

15 Las enfermedades o los trastornos autoinmunitarios que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar mediante las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otras, uno o más de los siguientes: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia hemolítica, trombocitopenia, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura (p. ej., púrpura de Henoch-Schoenlein), autoinmunitaria, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, miastenia gravis, enfermedad de Graves (hipertiroidismo) y diabetes mellitus resistente a insulina.

20 Trastornos adicionales que probablemente tengan un componente autoinmunitario que se pueden tratar, prevenir y/o diagnosticar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, artritis inducida por colágeno de tipo II, síndrome antifosfolípidos, dermatitis, encefalomielitis alérgica, miocarditis, policondritis recidivante, enfermedad cardíaca reumática, neuritis, uveítis, oftalmia, poliendocrinopatías, enfermedad de Reiter, síndrome de Stiff-Man, inflamación pulmonar autoinmunitaria, autismo, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus dependiente de insulina y trastornos oculares inflamatorios autoinmunitarios.

25 Trastornos adicionales que probablemente tengan un componente autoinmunitario que se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno (a menudo caracterizados por, por ejemplo, anticuerpos nucleares y otros nucleares), enfermedad del tejido conjuntivo mixto (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos frente a antígenos nucleares extraíbles (p. ej., ribonucleoproteína)), polimiositis (a menudo caracterizada por, por ejemplo, ANA no histonas), anemia perniciosa (a menudo caracterizada por, por ejemplo, células antiparietales, microsomas y anticuerpos frente al factor intrínseco), enfermedad de Addison idiopática (a menudo caracterizada por, por ejemplo, citotoxicidad humoral y celular), infertilidad (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos antiespermatozoicos), glomerulonefritis (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos frente a la membrana basal glomerular o complejos inmunitarios), penfigoide ampuloso (a menudo caracterizado por, por ejemplo, IgG y complemento en la membrana basal), síndrome de Sjogren (a menudo caracterizado por, por ejemplo, anticuerpos de múltiples tejidos y/o ANA no histonas específicos (SS-B)), diabetes mellitus (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos de las células de los islotes hormonales y celulares) y resistencia a fármacos adrenérgicos (incluida la resistencia a fármacos adrenérgicos con asma o fibrosis quística) (a menudo caracterizar por, por ejemplo, anticuerpos frente a los receptores beta-adrenérgicos).

30 Trastornos adicionales que pueden tener un componente autoinmunitario que se puede tratar, prevenir, diagnosticar y/o proponer con las proteínas de fusión de la albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, hepatitis crónica activa (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos del músculo liso), cirrosis biliar primaria (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos mitocondriales), otra insuficiencia de glándulas endocrinas (a menudo caracterizado por, por ejemplo, anticuerpos específicos de tejido en algunos casos), vitíligo (a menudo caracterizado por, por ejemplo, anticuerpos de melanocitos), vasculitis (a menudo caracterizada por, por ejemplo, Ig y complemento en las paredes vasculares y/o complemento bajo en suro), post-M1 (a menudo caracterizado por, por ejemplo, anticuerpos miocárdicos), síndrome de cardiomiopatía (a menudo caracterizado por, por ejemplo, anticuerpos miocárdicos), urticaria (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos IgG e IgM contra IgE), dermatitis atópica (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos IgG e IgM contra IgE), asma (a menudo caracterizada por, por ejemplo, anticuerpos IgG e IgM contra IgE) y muchos otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos y atroficos.

- En una realización preferida, las enfermedades autoinmunitarias y trastornos y/o afecciones asociadas con las enfermedades y trastornos citados anteriormente se tratan, previenen, diagnostican y/o pronostican usando, por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. En una realización preferida específica, la artritis reumatoide se trata, previene y/o diagnostica usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.
- En otra realización preferida específica, el lupus eritematoso sistémico se trata, previene y/o diagnostica usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. En otra realización preferida específica, la nefropatía por IgA se trata, previene y/o diagnostica usando las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.
- En otra realización preferida específica, las enfermedades autoinmunitarias y trastornos y/o afecciones asociadas con las enfermedades y trastornos citados anteriormente se tratan, previenen, diagnostican y/o pronostican usando, por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.
- En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar como agente(s) inmunosupresores.
- Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, trastornos y/o afecciones de las células hematopoyéticas. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se podrían usar para aumentar la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo células madre pluripotenciales, en un esfuerzo para tratar o prevenir dichas enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con una disminución de determinados (o muchos) tipos de células hematopoyéticas, incluyendo, entre otros, leucopenia, neutropenia, anemia y trombocitopenia. Como alternativa, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían usar para aumentar la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo células madre pluripotenciales, en un esfuerzo para tratar o prevenir dichas enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con un incremento de determinados (o muchos) tipos de células hematopoyéticas, incluyendo, entre otros, histiocirrosis.
- Las reacciones alérgicas y afecciones como asma (en particular, asma alérgica) u otros problemas respiratorios también se pueden tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar usando las proteínas de fusión de la invención. y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención. Además, estas moléculas se pueden usar para tratar, prevenir, pronosticar y/o diagnosticar anafilaxia, hipersensibilidad a una molécula antigénica o incompatibilidad de grupo sanguíneo.
- Adicionalmente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar las reacciones alérgicas mediadas por IgE. Dichas reacciones alérgicas incluyen, entre otras, asma, rinitis y eccema. En realizaciones específicas las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden usar para modular las concentraciones de IgE *in vitro* o *in vivo*.
- Adicionalmente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención tienen usos en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de afecciones inflamatorias. Por ejemplo, ya que las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, pueden inhibir la activación, proliferación y/o diferenciación de células implicadas en una respuesta inflamatoria, estas moléculas se pueden usar para prevenir y/o tratar afecciones inflamatorias crónicas y agudas. Dichas afecciones inflamatorias incluyen, entre otras, por ejemplo, inflamación asociada con infección (p. ej., shock séptico, sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), lesión por reperfusión tras isquemia, letalidad de endotoxina, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocinas o quimocinas, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, hiperproducción de citocinas (p. ej., TNF o IL-1), trastornos respiratorios (p. ej., asma y alergia); trastornos gastrointestinales (p. ej., enfermedad intestinal inflamatoria); cánceres (p. ej., gástrico, ovárico, pulmonar, de vejiga, hepático y de mama); trastornos de SNC (p. ej., esclerosis múltiple, lesión cerebral isquémica y/o ictus, lesión cerebral traumática, trastornos neurodegenerativos (p. ej., enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer); demencia relacionada con el SIDA; y enfermedad de priones); trastornos cardiovasculares (p. ej., aterosclerosis, miocarditis, enfermedad cardiovascular y complicación por derivación cardiopulmonar); así como muchas enfermedades, afecciones y trastornos adicionales que se caracterizan por inflamación (p. ej., hepatitis, artritis reumatoide, gota, traumatismo, pancreatitis, sarcoidosis, dermatitis, lesión por reperfusión tras isquemia renal, enfermedad de Grave, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus y rechazo de trasplante alogénico).

Dado que la inflamación es un mecanismo de defensa fundamental, los trastornos inflamatorios pueden afectar a casi cualquier tejido del cuerpo. De acuerdo con lo anterior, las proteínas de fusión de la invención y/o los



- polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, tienen usos en el tratamiento de trastornos inflamatorios específicos de tejido, incluyendo, entre otros, adrenalitis, alveolitis, angiocolicistitis, apendicitis, balanitis, blefaritis, bronquitis, bursitis carditis, celulitis, cervicitis, colecistitis, corditis, coclitis, colitis, conjuntivitis, cistitis, dermatitis, diverticulitis, encefalitis, endocarditis, esofagitis, eustaquitis, fibrositis, folliculitis, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, glositis, hepatosplenitis, queratitis, laberintitis, laringitis, linfangitis, mastitis, otitis media, meningitis, metritis, mucitis, miocarditis, miositis, miringitis, nefritis, neuritis, orquitis, osteocondritis, otitis, pericarditis, peritendonitis, peritonitis, faringitis, flebitis, poliomieltitis, prostatitis, pulpitis, retinitis, rinitis, salpingitis, escleritis, esclerocoroiditis, escrotitis, sinusitis, espondilitis, esteatitis, estomatitis, sinovitis, siringitis, tendinitis, amigdalitis, uretritis y vaginitis.
- 5 En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar los rechazos de órganos y la enfermedad del injerto contra el huésped. El rechazo de órganos se produce por la destrucción de las células inmunitarias huésped de tejido transplantado a través de una respuesta inmunitaria. De un modo similar, una respuesta inmunitaria también está implicada en el EICH pero, en este caso,
- 10 las células inmunitarias transplantadas extrañas destruyen los tejidos del huésped. Los polipéptidos, anticuerpos, o polinucleótidos de la invención, y/o agonistas o antagonistas de los mismos que inhiben una respuesta inmunitaria, en particular la activación, proliferación, diferenciación o quimiotaxis de linfocitos T pueden ser un tratamiento eficaz en la prevención del rechazo de órganos o la EICH. En realizaciones específicas las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención que inhiben una
- 15 respuesta inmunitaria, en particular la activación, proliferación, diferenciación o quimiotaxis de linfocitos T pueden ser un tratamiento eficaz en la prevención de la alergia experimental y el rechazo hiperagudo de xenoinjerto.
- 20 En otras realizaciones, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención son útiles para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar enfermedades del complejo inmunitario incluyendo, entre otras, la enfermedad del suero, glomerulonefritis postinfección por estreptococos, poliarteritis nodosa y vasculitis inducida por complejo inmunitario.
- 25 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para tratar, detectar y/o prevenir agentes infecciosos. Por ejemplo, incrementando la respuesta inmunitaria, en particular incrementando la proliferación, activación y/o diferenciación de los linfocitos B y/o T, las enfermedades infecciosas se pueden tratar, detectar y/o prevenir. La respuesta inmunitaria se puede aumentar potenciando una respuesta inmunitaria existente o iniciando una respuesta inmunitaria nueva. Como alternativa, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden inhibir directamente el agente infeccioso (consúltese la sección de la solicitud en la que se enumeran los agentes infecciosos etc.) sin necesariamente provocar una respuesta
- 30 inmunitaria.
- 35 En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como adyuvante de vacuna que potencia la capacidad de respuesta inmunitaria a un antígeno. En una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se usan como adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias específicas de tumor.
- 40 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias antivirales. Las respuestas inmunitarias antivirales que se pueden potenciar usando las composiciones de la invención como adyuvante incluyen virus y enfermedades asociadas con virus o síntomas descritos en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a un virus, enfermedad o síntomas seleccionado del grupo que consiste en: SIDA, meningitis, Dengue, EBV y hepatitis (p. ej., hepatitis B). Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar como adyuvante para potenciar una
- 45 respuesta inmunitaria a un virus, enfermedad o síntoma seleccionados del grupo que consiste en: VIH/SIDA, virus sincitial respiratorio, Dengue, rotavirus, encefalitis B japonesa, gripe A y B, parainfluenza, sarampión, citomegalovirus, rabia, Junin, Chikungunya, fiebre del valle del Rift, herpes simple y fiebre amarilla.
- 50 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias antibacterianas o antifúngicas. Las respuestas inmunitarias antibacterianas o antifúngicas que se pueden potenciar usando las proteínas de fusión de albúmina de la invención como adyuvante incluyen bacterias u hongos y enfermedades o síntomas asociados con bacteria u hongos descritos en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a una bacteria u hongo, enfermedad o síntoma seleccionados del grupo que consiste en: tétanos, difteria, botulismo y meningitis de tipo B.
- 55 En otra realización específica, las composiciones de la invención se usan como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a una bacteria u hongo, enfermedad o síntoma seleccionados del grupo que consiste en:
- 60

*Vibrio cholerae*, *Mycobacterium leprae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Meisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, Group B streptococcus, *Shigella spp.*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica y *Borrelia burgdorferi*.

5 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias antiparasitarias. Las respuestas inmunitarias antiparasitarias que se pueden potenciar usando las proteínas de fusión de albúmina de la invención como adyuvante incluyen parásitos y enfermedades o síntomas asociados con parásitos pueden usar como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria descritos en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica. Las las proteínas de fusión de albúmina de la  
10 invención se pueden usar como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a un parásito. En otra realización específica, las composiciones de la invención se usan como adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria a Plasmodio (paludismo) o Leishmania.

15 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también se pueden usar para tratar enfermedades infecciosas, incluidas silicosis, sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática; por ejemplo, impidiendo el reclutamiento y activación de fagocitos mononucleares.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar como antígeno para la gneración de anticuerpos para inhibir o potenciar respuestas inmunitarias contra polipéptidos de la invención.

20 En una realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se administran a un animal (p. ej., ratón, rata, conejo, hámster, cobaya, cerdo, cerdo enano, pollo, camello, cabra, caballo, vaca, oveja, perro, gato, primate no humano y ser humano, más preferentemente ser humano) para refirzar el sistema inmunológico para producir cantidades crecientes de uno o más anticuerpos (p. ej., IgG, IgA, IgM e IgE), para inducir la producción de anticuerpos de mayor afinidad y el cambio de clase de inmunoglobulinas (p. ej., IgG, IgA, IgM e IgE), y/o aumentar una respuesta  
25 inmunitaria.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como estimulantes de la respuesta de linfocitos B a los patógenos.

30 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención de la invención se usan como activadores de linfocitos T.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agentes que elevan el estado inmunitario de un individuo antes de la recepción de las terapias inmunosupresoras.

35 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agentes para inducir anticuerpos de afinidad.

40 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agentes para incrementar las concentraciones en suero de inmunoglobulina.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agentes para acelerar la recuperación de los individuos inmunocomprometidos.

45 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agentes para reforzar la capacidad de respuesta inmunitaria entre poblaciones ancianas y/o neonatos.

50 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinuceótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como potenciador del sistema inmunológico antes, durante o después del trasplante de médula ósea y/u otros trasplantes (p. ej., trasplante alogénico o xenogénico de órganos). Con respecto al trasplante, las composiciones de la invención se pueden administrar antes de, de forma concomitante con y/o después del trasplante. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se administran después del trasplante, antes del comienzo de la recuperación de las poblaciones de linfocitos T. En otra realización específica, las composiciones de la invención se administran primero después del trasplante, después del comienzo de la recuperación de las poblaciones de linfocitos T, pero antes de la  
55 recuperación completa de las poblaciones de linfocitos B.

- 5 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agente para reforzar la capacidad de respuesta inmunitaria entre individuos que tienen una pérdida adquirida de la función de los linfocitos B. Las afecciones que dan lugar a una pérdida adquirida de la función de los linfocitos B que se puede mejorar o tratar administrando las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, infección por VIH, SIDA, trasplante de médula ósea y leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B.
- 10 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agentes para reforzar la capacidad de respuesta inmunitaria entre individuos que tienen una deficiencia inmunitaria temporal. Las afecciones que dan lugar a una deficiencia inmunitaria temporal que se puede mejorar o tratar administrando las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, recuperación de infecciones virales (p. ej., gripe), afecciones asociadas con malnutrición, recuperación de mononucleosis infecciosa o afecciones asociadas con estrés, recuperación del sarampión, recuperación de transfusión sanguínea y recuperación de cirugía.
- 15 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como reguladores de la presentación de antígenos por los monocitos, las células dendríticas y/o los linfocitos B. En una realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención potencian la presentación de antígeno o antagonizan la presentación de antígeno *in vitro* o *in vivo*. Además, esta potenciación o antagonismo de la presentación de antígeno puede ser útil como tratamiento antitumoral o para modular el sistema inmunológico.
- 20 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como agentes para dirigir el sistema inmunológico del individuo al desarrollo de una respuesta humoral (es decir, TH2) frente a una respuesta celular TH1.
- 25 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como medios para inducir la proliferación del tumor y por tanto, lo hacen más susceptible a agentes antineoplásicos. Por ejemplo, el mieloma múltiple es una enfermedad de división lenta y por tanto, resistente a casi todos los regímenes antineoplásicos. Si se obligara a estas células a proliferar con mayor rapidez, probablemente cambiaría su perfil de susceptibilidad.
- 30 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como estimulantes de la producción de linfocitos B en enfermedades tales como SIDA, trastorno linfocitario crónico y/o inmunodeficiencia variable común.
- 35 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como terapia para la generación y/o regeneración de tejidos linfoides tras cirugía, traumatismos o defectos genéticos. En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar en el pretratamiento de las muestras de médula ósea antes del trasplante.
- 40 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como terapia a base de genes para trastornos hereditarios genéticamente que dan lugar a incompetencia inmunitaria/inmunodeficiencia, tal como lo observado entre los pacientes con IDCG.
- 45 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como medios de activación de los monocitos/macrófagos para defender contra enfermedades parasitarias que afectan a los monocitos, tales como leishmaniosis.
- 50 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como medios de regulación de citocinas secretadas producidas por polipéptidos de la invención.
- 55 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan en una o más de las aplicaciones descritas en el presente documento, así como se pueden aplicar a medicina veterinaria.
- En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como medios de bloqueo de varios aspectos de las respuestas inmunitarias a agentes extraños o propios. Ejemplos de enfermedades o afecciones en las que se puede desear el bloqueo de determinados aspectos de las respuestas inmunitarias incluyen trastornos

autoinmunitarios, tales como lupus y artritis, así como respuestas inmunitarias a alergias cutáneas, inflamación, enfermedad intestinal, lesiones y enfermedades/trastornos asociados con patógenos.

5 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como terapia para prevenir la proliferación de linfocitos B y la secreción de Ig asociada con enfermedades autoinmunitarias tales como púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple.

10 En otra realización específica, los polipéptidos, antibodies, polynucleotides and/or agonists or antagonists de las presentes proteínas de fusión de la invención se pueden usar como inhibidores de la migración de los linfocitos B y/o T en células endoteliales. Esta actividad altera la arquitectura ticular o las respuestas afines y es útil para, por ejemplo, alterar las respuestas inmunitarias y bloquear la sepsis.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como terapia para la hipergammaglobulinemia crónica evidente en enfermedades tales como gammopatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI), enfermedad de Waldenstrom, gammopatías monoclonales idiopáticas relacionadas y plasmacitomas.

15 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para, por ejemplo, inhibir la quimiotaxis del polipéptido y la activación de los macrófagos y sus precursores y de los neutrófilos, basófilos, linfocitos B y algunas subpoblaciones de células T, por ejemplo células T activadas y CD8 citotóxicas y células asesinas naturales, en determinadas enfermedades autoinmunitarias e infecciosas e inflamatorias crónicas. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias se describen en el presente documento e incluyen esclerosis múltiple y diabetes dependiente de insulina.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan también pueden usarse para tratar el síndrome hipereosinófilo mediante, por ejemplo, la prevención de la producción y migración de eosinófilos.

25 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para potenciar o inhibir la lisis celular mediada por el complemento.

30 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para potenciar o inhibir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden usarse para tratar la aterosclerosis mediante, por ejemplo, la prevención de la infiltración de monocitos en la pared arterial.

35 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden usarse para tratar el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA).

40 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles para estimular la reparación de heridas y tisular y/o estimular la reparación de enfermedades o trastornos vasculares o linfáticos. Adicionalmente, las proteínas de fusión de la invención se pueden usar para estimular la regeneración de superficies mucosas.

45 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para diagnosticar, pronosticar, tratar y/o prevenir un trastorno caracterizado por inmunodeficiencia primaria o adquirida, producción deficiente de inmunoglobulina en suero, infecciones recurrentes y/o disfunción del sistema inmunológico. Adicionalmente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para tratar o prevenir infecciones de las articulaciones, los huesos, la piel y/o las glándulas paratiroideas, infecciones transmitidas por la sangre (p. ej., sepsis, meningitis, artritis séptica y/o osteomielitis), enfermedades autoinmunitarias (p. ej., las divulgadas en el presente documento), trastornos inflamatorios y neoplasias malignas y/o cualquier enfermedad o trastorno o afección asociada con estas infecciones, enfermedades, trastornos y/o neoplasias malignas) incluyendo, entre otros, IDVC, otras inmunodeficiencias primarias, enfermedad por VIH, LLC, bronquitis recurrente, sinusitis, otitis media, conjuntivitis, neumonía, hepatitis, meningitis, herpes zóster (p. ej., herpes zóster grave) y/o pneumocystis carinii. Otras enfermedades y trastornos que se pueden prevenir, diagnosticar, pronosticar y/o tratar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otras, infección por VIH, infección por HTLV-BLV, linfopenia, anemia por disfunción bactericida de los fagocitos, trombocitopenia y hemoglobinuria.

55 En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las

proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para tratar y/o diagnosticar a un individuo con enfermedad por inmunodeficiencia variable común ("IDVC", también conocida como "agammaglobulinemia adquirida" e "hipogammaglobulinemia adquirida") o un subconjunto de esta enfermedad.

5 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para diagnosticar, pronosticar, prevenir y/o tratar cánceres o neoplasias. incluyendo cánceres o neoplasias elacionadas con las células inmunitarias o con el tejido inmunitario. Ejemplos de cánceres o neoplasias que se pueden prevenir, diagnosticar o tratar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma no  
10 hodgkiniano, anemia linfocítica aguda (LLA), leicemia linfocítica crónica, plasmacitomas, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, enfermedades transformadas por el EBV y/o enfermedades y trastornos descritos en la sección titulada "Trastornos hiperproliferativos" en otro lugar en el presente documento.

15 En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como terapia para disminuir la proliferación celular de los linfomas de linfocitos B grandes.

En otra realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan como medios para reducir la implicación de los linfocitos T y la Ig asociadas con la leucemia mielógena crónica.

20 En realizaciones específicas, las composiciones de la invención se usan como agentes para reforzar la capacidad de respuesta inmunitaria entre los individuos inmunodeficientes de linfocitos B tales como, por ejemplo, un individuo que ha sufrido una esplenectomía parcial o completa.

#### **Trastornos relacionados con la sangre**

25 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para modular la actividad hemostática (cese del sangrado) o trombolítica (disolución de coágulos). Por ejemplo, aumentando la actividad hemostática o trombolítica, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se podrían usar para tratar o prevenir las enfermedades, trastornos y/o afecciones de la coagulación de la sangre (p. ej., afibrinogenemia, deficiencias de factores, hemofilia), enfermedades, trastornos y/o afecciones de las plaquetas sanguíneas (p. ej., trombocitopenia) o heridas resultantes de traumatismos, cirugías u otras causas. Como  
30 alternativa, las proteínas de fusión de la invención que pueden disminuir la actividad hemostática o trombolítica se podrían usar para inhibir o disolver los coágulos. Estas moléculas podrían ser importantes en el tratamiento o prevención de ataques cardíacos (infartos), ictus o cicatrización.

35 En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para prevenir, diagnosticar, pronosticar y/o tratar la trombosis, la trombosis arterial, la trombosis venosa, la tromboembolia, la embolia pulmonar, la aterosclerosis, el infarto de miocardio, el ataque isquémico transitorios, la angina inestable. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para la prevención de la oclusión de injertos en la safena, para reducir el riesgo de la trombosis alrededor de un procedimiento que podría acompañar a procedimientos de angioplastia, para reducir el riesgo de ictus en pacientes  
40 con fibrilación auricular, incluyendo la fibrilación auricular no reumática, para reducir el riesgo de embolia asociada con válvulas cardíacas mecánicas y/o la enfermedad de la válvula mitral. Otros usos para las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, la prevención de oclusiones en dispositivos extracorpóreos (p. ej., cánulas intravasculares, derivaciones del acceso vascular en pacientes en hemodiálisis, máquinas de hemodiálisis y máquinas de derivación cardiopulmonar).

45 En itra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para prevenir, diagnosticar, pronosticar y/o tratar enfermedades y trastornos de la sangre y/o de los órganos formadores de la sangre asociadas con el o los tejidos en los que se expresa el polipéptido de la invención.

50 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para modular la actividad hematopoyética (la formación de células sanguíneas). Por ejemplo, las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para aumentar la cantidad de todas o sibpoblaciones de células sanguíneas, tales como, por ejemplo, eritrocitos, linfocitos (linfocitos B o T), células mieloides (p. ej., basófilos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos mastocitos) y plaquetas. La capacidad para disminuir la cantidad de las células sanguíneas o de las subpoblaciones de las células sanguíneas pueden ser  
55 útiles en la prevención, detección, diagnóstico y/o tratamiento de anemias y leucopenias descritas más adelante. Como alternativa, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para disminuir la cantidad de todas o subpoblaciones de células sanguíneas, tales como, por ejemplo, eritrocitos, linfocitos (linfocitos B o T), células

mieloides (p. ej., basófilos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos mastocitos) y plaquetas. La capacidad para disminuir la cantidad de las células sanguíneas o de las subpoblaciones de las células sanguíneas pueden ser útiles en la prevención, detección, diagnóstico y/o tratamiento de leucocitosis, tales como, por ejemplo eosinofilia.

5 Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para prevenir, tratar o diagnosticar la discrasia sanguínea.

10 Las anemias son afecciones en las que el número de glóbulos rojos o la cantidad de hemoglobina (la proteína transportadora del oxígeno) en ellos está por debajo de lo normal. La anemia se puede deber a una hemorragia excesiva, a disminución de la producción de células sanguíneas o al incremento de la destrucción de glóbulos rojos (hemólisis). Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de las anemias. Las anemias que se pueden tratar, prevenir o diagnosticar mediante las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen anemia por déficit de hierro, anemia hipocrómica, anemia microcítica, clorosis, anemia sideroblástica hereditaria, anemia sideroblástica adquirida idiopática, aplasia de glóbulos rojos, anemia megaloblástica (p. ej., anemia perniciosa (deficiencia de vitamina B12) y anemia por deficiencia de ácido fólico), anemia aplásica, anemias hemolíticas (p. ej., anemia hemolítica autoinmunitarias, anemia hemolítica micropangiopática y hemoglobinuria nocturna paroxística). Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de anemias asociadas con enfermedades, incluyendo, entre otras, anemias asociadas con lupus eritematoso sistémico, cánceres, linfomas, enfermedad renal crónica y esplenomegalia. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de anemias que se producen por tratamientos farmacológicos tales como anemias asociadas con metildopa, dapsona y sulfas. Adicionalmente, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de anemias asociadas con una arquitectura anormal de los glóbulos rojos, incluyendo, entre otros, esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, deficiencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenada y drepanocitosis.

30 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de anomalías de la hemoglobina (p. ej., las asociadas con la drepanocitosis, la enfermedad de la hemoglobina C, la enfermedad de la hemoglobina S-C y la enfermedad de la hemoglobina E). Adicionalmente, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de las talasemias, incluyendo, entre otras, las formas mayoritarias y minoritarias de alfa-talasemia y beta-talasemia.

35 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de trastornos hemorrágicos incluyendo, entre otros, trombocitopenia (p. ej., púrpura trombocitopénica idiopática y púrpura trombocitopénica trombótica), enfermedad de Von Willebrand, trastornos plaquetarios hereditarios (p. ej., enfermedad del almacenamiento tal como síndrome de Chediak-Higashi y de Hermansky-Pudlak, disfunción del tromboxano A2, tromboastenia y síndrome de Bernard-Soulier), síndrome irémico hemolítico, hemofilias tales como hemofilia A o deficiencia del factor VII y enfermedad de Christmas o deficiencia del factor IX, telangiectasia hemorrágica hereditaria, también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber, púrpura alérgica (púrpura de Henoch Schonlein) y coagulación intravascular diseminada.

45 El efecto de las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención sobre el tiempo de coagulación de la sangre se puede monitorizar usando cualquiera de las pruebas de coagulación conocidas en la técnica incluyendo, entre otras, el tiempo de tromboplastina parcial de sangre entera (PTT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), el tiempo de coagulación activada (ACT), el tiempo de coagulación activada recalcificada o el tiempo de coagulación de Lee-White.

50 Varias enfermedades y diversos fármacos pueden producir disfunción plaquetaria. Por tanto, en una realización específica, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la disfunción plaquetaria adquirida, tales como la disfunción plaquetaria que acompaña a la insuficiencia renal, leucemia, mieloma múltiple, cirrosis hepática y lupus eritematoso sistémico, así como la disfunción plaquetaria asociada con tratamientos farmacológicos, incluyendo el tratamiento con aspirina, ticlopidina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (usados para la artritis, el dolor y los esguinces) y penicilina a dosis altas.

60 En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por o asociados con un incremento o disminución de los números de glóbulos blancos. Se produce leucopenia cuando el número de glóbulos blancos disminuye por debajo

- de lo normal. Las leucopenias incluyen, entre otros, neutropenia y linfocitopenia. Un incremento en el número de glóbulos blancos en comparación con lo normal se conoce como leucocitosis. El cuerpo genera números incrementados de glóbulos blancos durante las infecciones. Por tanto, la leucocitosis puede simplemente ser un parámetro fisiológico que refleja la infección. Como alternativa, la leucocitosis puede ser un indicador de lesión u otra enfermedad, tal como cáncer. Las leucocitosis incluyen, entre otros, eosinofilia y acumulaciones de macrófagos. Las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la leucopenia. Las proteínas de fusión de albúmina la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la leucocitosis.
- 5
- 10 La leucopenia puede ser una disminución generalizada de todos los tipos de glóbulos blancos y puede ser una depleción específica de tipos concretos de glóbulos blancos. Por tanto, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de la disminución del número de neutrófilos, conocida como neutropenia. Las neutropenias que se pueden diagnosticar, proponer, prevenir y/o tratar con las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otras, agranulocitosis genética infantil, neutropenia familiar, neutropenia cíclica, neutropenias resultantes de o asociadas con deficiencias en la dieta (p. ej., deficiencia de vitamina B 12 o deficiencia de ácido fólico), neutropenias resultantes de o asociadas con tratamiento farmacológicos (p. ej., regímenes antibióticos tales como tratamiento con penicilina, tratamiento con sulfonamidas, tratamiento con anticoagulantes, fármacos anticonvulsivos, fármacos anti-tiroideos y quimioterapia para el cáncer) y neutropenias resultantes de la destrucción incrementada de neutrófilos que se puede producir en asociación con algunas infecciones bacterianas o víricas, trastornos alérgicos, enfermedades autoinunitarias, afecciones en las que un individuo presenta esplenomegalia (p. ej., síndrome Felty, malaria y sarcoidosis) y algunos regímenes teraéuticos farmacológicos.
- 15
- 20 Las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de linfocitopenias (número disminuido de linfocitos B y/o T), incluyendo, entre otras, linfocitopenias resultantes o asociadas con estrés, tratamientos farmacológicos (p. ej., tratamiento farmacológico con corticosteroides, quimioterapias contra el cáncer y/o radioterapias), infección por SIDA y/u otras enfermedades, tales como, por ejemplo, cáncer, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, infecciones crónicas, algunas infecciones víricas y/o trastornos hereditarios (p. ej., síndrome de DiGeorge, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada grave, ataxia telangiectasia).
- 25
- 30 Las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con los números de macrófagos y/o la función de los macrófagos incluyendo, entre otras, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Letterer-Siwe y enfermedad de Hand-Schuller-Christian.
- 35
- 40 En otra realización, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con los números de eosinófilos y/o la función de los eosinófilos incluyendo, entre otras, síndrome hipereosinófilo idiopático, síndrome de eosinofilia-mialgia y enfermedad de Hand-Schuller-Christian.
- 45
- 50 En otra realización más, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de leucemias y linfomas incluyendo, entre otras, leucemia linfocítica aguda (linfoblástica) (LLA), leucemia mieloide aguda (mielocítica, mielógena, mieloblástica o mielomonocítica), leucemia linfocítica crónica (p. ej., leucemias de linfocitos B, leucemias de linfocitos T, síndrome de Sezary y leucemia de células peludas), leucemia mielocítica crónica (mielide, mielógena o granulocítica), linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Burkitt y fungoides mucosos.
- 55
- En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos de células plasmáticas incluyendo, entre otras, discrasias de células plasmáticas, gammopatías monoclonales, gammopatías monoclonales, de significado indeterminado, mieloma múltiple, macroglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, crioglobulinemia y fenómeno de Raynaud.
- En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en el diagnóstico, pronóstico, prevención y/o tratamiento de trastornos mieloproliferativos, incluyendo, entre otros, policitemia vera, policitemia relativa, policitemia secundaria, mielofibrosis, mielofibrosis aguda, metaplasma mieloide agnógénica, trombocitopenia (incluyendo trombocitemia primaria y secundaria) y leucemia mielocítica crónica.
- En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las

proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como tratamiento previo a la cirugía, para aumentar la producción de células sanguíneas.

5 En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como agentes para potenciar la migración, fagocitosis, producción de superóxido, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos.

10 En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como agentes para aumentar el número de células madre en circulación antes de la aféresis de células madre. En otra realización específica las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, pueden ser útiles como agentes para aumentar el número de células madre en circulación antes de la aféresis de plaquetas.

15 En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles como agentes para incrementar la producción de citocinas.

En otras realizaciones, las proteínas de fusión de albúmina la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden ser útiles en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de trastornos hematopoyéticos primarios.

### **Enfermedades infecciosas**

20 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para tratar o detectar agentes infecciosos. Por ejemplo, incrementando la respuesta inmunitaria, en particular incrementando la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y/o T, las enfermedades infecciosas se pueden tratar, detectar y/o prevenir. La respuesta inmunitaria se puede aumentar potenciando una respuesta inmunitaria existente o iniciando una respuesta inmunitaria nueva. Como alternativa, las  
25 proteínas de fusión de la invención también pueden inhibir directamente el agente infeccioso, sin provocar necesariamente una respuesta inmunitaria.

Los virus son un ejemplo de un agente infeccioso que puede causar enfermedad o síntomas que se pueden tratar o detectar mediante las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las  
30 proteínas de fusión de albúmina de la invención. Ejemplos de virus, incluyen, entre otros, los siguientes virus de ADN y ARN y familias virales. Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bonyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Dengue, VEB, VIH, Flaviviridae, Hepadnaviridae (Hepatitis), Herpesviridae (tales como, citomegalovirus, herpes simple, herpes zoster), mononegavirus (por ejemplo, Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (por ejemplo, la influenza A, influenza B y parainfluenza), virus del papiloma, Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (como la viruela vacunal), Reoviridae (por  
35 ejemplo, Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus) y Togaviridae (por ejemplo, Rubivirus). Los virus incluidos en estas familias pueden causar diversas enfermedades o síntomas, incluyendo, entre otros: artritis, bronquiolitis, virus sincitial respiratorio, encefalitis, infecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis), síndrome de fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, crónica activa, Delta), encefalitis B japonesa, Junín, Chikungunya, fiebre del Valle del Rift, fiebre amarilla, meningitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, el SIDA), neumonía, linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, paperas, parainfluenza, rabia, resfriado común, poliomielitis, leucemia, rubéola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (por ejemplo, de Kaposi, verrugas) y viremia. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican  
40 las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para tratar o detectar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden usarse para tratar:  
45 meningitis, dengue, EBV y / o hepatitis (por ejemplo, hepatitis B). En una realización específica adicional, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden usarse para tratar a los pacientes que no responden a una o más de las demás proteínas de fusión de vacunas contra la hepatitis comercialmente disponibles. En una realización específica adicional, las  
50 proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para tratar el SIDA.

De un modo similar, los agentes bacterianos y fúngicos que pueden producir enfermedades o síntomas que se pueden tratar o detectar con las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican  
55 las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, las siguientes bacterias gramnegativas y grampositivas, familias bacterianas y hongos: Actinomyces (p. ej., Norcardia), Acinetobacter, *Cryptococcus neoformans*, Aspergillus, Bacillaceae (p. ej., *Bacillus anthracis*), Bacteroides (p. ej., *Bacteroides fragilis*), Blastomycosis, Bordetella, Borrelia (p. ej., *Borrelia burgdorferi*), Brucella, Candidia, Campylobacter, Chlamydia, Clostridium (p. ej., *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetant*), Coccidioides, Corynebacterium (p. ej., *Corynebacterium diphtheriae*), Cryptococcus, Dermatocycoses, *E. coli* (p. ej., *E.*



5 *coli* enterotoxigénica y *E. coli* enterohemorrágica), Enterobacter (p. ej., *Enterobacter aerogenes*), Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella (p. ej., *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*), Serratia, Yersinia, Shigella), Erysipelothrix, Haemophilus (p. ej., *Haemophilus influenza* de tipo B), Helicobacter, Legionella (p. ej., *Legionella pneumophila*), Leptospira, Listeria (p. ej., *Listeria monocytogenes*), Mycoplasma, Mycobacterium (p. ej., *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*), Vibrio (p. ej., *Vibrio cholerae*), Neisseriaceae (p. ej., *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*), Pasteurellaceae, Proteus, Pseudomonas (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*), Rickettsiaceae, Spirochetes (p. ej., Treponema spp., Leptospira spp., Borrelia spp.), Shigella spp., Staphylococcus (p. ej., *Staphylococcus aureus*), Meningioccus, Pneumococcus y Streptococcus (p. ej., *Streptococcus pneumoniae* y estreptococos de los grupos A, B y C Streptococci) y Ureaplasmas. Estas familias bacterianas, parasitarias y fúngicas pueden producir enfermedades o síntomas, incluyendo, entre otros: Infecciones resistentes a fármacos, bacteriemia, endocarditis, septicemia, infecciones oculares (p. ej., conjuntivitis), uveítis, tuberculosis, gingivitis, diarrea bacteriana, infecciones oportunistas (p. ej., infecciones relacionadas con el SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, caries dental, enfermedad de Reiter, infecciones del tracto respiratorio, tales como tos ferina o empiema, sepsis, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, intoxicación alimentaria. Enfermedad del legionario, inflamación crónica y aguda, eritema, infecciones por levaduras, tifoide, neumonía, gonorrea, meningitis (p. ej., meningitis de tipos A y B), clamidia, sífilis, lepra, difteria, brucelosis, úlceras pépticas, ántrax, abortos espontáneos, defectos de nacimiento, neumonía, infecciones pulmonares, infecciones, sordera, ceguera, letargo, malestar, vómitos, diarrea crónica, enfermedad de Crohn, colitis, vaginosis, esterilidad, enfermedades inflamatorias de la pelvis, candidiasis, paratuberculosis, tuberculosis, lupus, botulismo, gangrena, tétanos, impétigo, fiebre reumática, fiebre escarlata, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (p. ej., celulitis, dermatomycosis, toxemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas, infecciones nosocomiales. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para tratar o detectar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden usarse para tratar: tétanos, difteria, botulismo y/o meningitis de tipo B.

Además, los agentes parasitarios causantes de enfermedades o síntomas que se pueden tratar, prevenir y/o diagnosticar con las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención incluyen, entre otros, las siguientes familias o clases: amebiasis, babesiosis, coccidiosis, criptosporidiosis, dientamoebiasis, dourinea, ectoparásitos, giardias, helmintiasis, leishmaniasis, esquistosoma, teileriasis, toxoplasmosis. Tripanosomiasis y tricomonas y esporozoos (p. ej., *Plasmodium virax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*). Estos parásitos pueden causar diversas enfermedades o síntomas, incluyendo, entre otros: Escabiosis, trombiculiasis, infecciones oculares, enfermedades intestinales (p. ej., disentería, giardiasis), enfermedad hepática, enfermedad pulmonar, infecciones oportunistas (p. ej., relacionadas con el SIDA), malaria, complicaciones del embarazo y toxoplasmosis. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para tratar, prevenir y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se usan para tratar, prevenir y/o diagnosticar la malaria.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención podrían administrarse al paciente mediante una cantidad eficaz de una proteína de fusión de albúmina de la invención o retirando las células del paciente y devolviendo las células modificadas al paciente (terapia *ex vivo*). Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden usar como antígeno en una vacuna para producir una respuesta inmunitaria contra la enfermedad infecciosa.

### **Regeneración**

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para diferenciar, proliferar y atraer las células lo que conduce a la regeneración de tejidos. (Véase, Science 276:59 - 87 (1997)). La regeneración de tejidos se podría usar para reparar, sustituir o proteger tejidos dañados por defectos congénitos, traumatismos (heridas, quemaduras, incisiones o úlceras), la edad, enfermedades (p. ej., osteoporosis, artrosis, enfermedad periodontal, insuficiencia hepática), cirugía, incluida la cirugía plástica estética, fibrosis, lesión por reperfusión o daños por citocinas sistémicas.

Los tejidos que se pueden regenerar usando la presente invención incluyen órganos (p. ej., páncreas, hígado, intestino, riñón, piel, endotelio), músculo (liso, esquelético o cardíaco), vasculatura (incluyendo vasculares y linfáticos), tejido nervioso, hematopoyético y esquelético (huesos, cartílagos, tendones y ligamentos). Preferentemente, la regeneración se produce sin cicatrización o con una cicatrización menor. La regeneración también puede incluir angiogénesis.

Además, las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden aumentar la regeneración de los tejidos difíciles de cicatrizar. Por ejemplo, la regeneración aumentada de tendones/ligamentos aceleraría el tiempo de recuperación después del daño. Las proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la

invención también podrían usarse profilácticamente en un esfuerzo para evitar daños. Enfermedades específicas que podrían tratarse incluyen tendinitis, síndrome del túnel carpiano y otros defectos en tendones o ligamentos. Un ejemplo adicional de regeneración tisular de heridas no cicatrizantes incluye úlceras de presión, úlceras asociadas con insuficiencia vascular, heridas quirúrgicas y traumáticas.

5 De un modo similar, el tejido nervioso y cerebral también se podría regenerar usando proteínas de fusión de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención para proliferar y diferenciar las células nerviosas. Enfermedades que podrían tratarse usando este procedimiento incluyen enfermedades del sistema nervioso central y periférico, neuropatías o trastornos mecánicos y traumáticos (p. ej., trastornos de la médula espinal, traumatismo cerebral, enfermedad cerebrovascular e ictus). Específicamente, enfermedades asociadas con lesiones neurales periféricas, neuropatía periférica (p. ej., resultantes de quimioterapia u otras terapias médicas), neuropatías localizadas y enfermedades del sistema nervioso central (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y síndrome de Shy-Drager) podrían tratarse todas usando las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención.

15 **Otras actividades**

Una proteína de fusión de albúmina y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención puede usarse en el tratamiento para estimular la revascularización de tejidos isquémicos debido a varias enfermedades, tales como trombosis, arteriosclerosis y otras afecciones cardiovasculares. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención y/o los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden usarse para estimular la angiogénesis y la regeneración de extremidades, como se ha tratado anteriormente.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se puede usar para tratar heridas debidas a lesiones, quemaduras, reparaciones tisulares postoperatorias y úlceras, ya que son mitógenos para varias células de diferentes orígenes, tales como células de fibroblastos y células de músculos esqueléticos y por tanto, facilitan la reparación o sustitución de tejido dañado o enfermo.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también se puede usar para estimular el crecimiento neuronal y para tratar y prevenir el daño neuronal que se produce en ciertos trastornos neuronales o afecciones neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y el complejo relacionado con el SIDA. Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención puede tener la capacidad para estimular el crecimiento de condrocitos, por tanto se pueden usar para potenciar la regeneración ósea y periodontal y ayudar en los trasplantes de tejidos o injertos óseos.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también puede usarse para prevenir el envejecimiento de la piel por quemaduras solares mediante estimulación del crecimiento de los queratinocitos.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden emplear también para evitar pérdida del cabello, dado que los miembros de la familia de FGF activan células formadoras de pelo y promueven crecimiento de melanocitos. A lo largo de las mismas líneas, una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden emplear para estimular crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas y células de la médula ósea cuando se usan en combinación con otras citocinas.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también puede usarse para mantener los órganos antes del trasplante o para soportar el cultivo celular de tejidos primarios. Una proteína de fusión de albúmina de la invención también pueden usarse para inducir tejido de origen mesodérmico para diferenciarse en embriones tempranos.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también pueden aumentar o disminuir la diferenciación o proliferación de las células madre embrionarias, además de, como se ha tratado anteriormente, el linaje hematopoyético.

50 Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden usar también para modular características de mamíferos, tales como altura corporal, peso, color del pelo, color de ojos, piel, porcentaje de tejido adiposo, pigmentación, tamaño y forma (por ejemplo, cirugía estética). De un modo similar, una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para modular el metabolismo del mamífero que afecta al catabolismo, anabolismo, procesamiento, uso y almacenamiento de energía.

Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención se pueden usar para cambiar el estado mental o el estado físico de un mamífero influyendo

sobre los biorritmos, los ritmos cardíacos, la depresión (incluidos los trastornos depresivos), la tendencia a la violencia, la tolerancia del dolor, las capacidades reproductoras (preferentemente mediante actividad de actividad o de tipo inhibidora), los niveles hormonales o endocrinos, el apetito, la libido, la memoria, el estrés u otras cualidades de cognición.

- 5 Una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la invención también pueden usarse como aditivos o conservantes alimentarios, para incrementar o disminuir las capacidades de conservación, el contenido en grasas, los lípidos, las proteínas, los hidratos de carbono, las vitaminas, los minerales, los cofactores u otros componentes nutricionales.

10 Las aplicaciones citadas anteriormente tienen usos en una amplia variedad de huéspedes. Dichos huéspedes incluyen, entre otros, seres humanos, murinos, conejos, cabras, cobayas, camellos, caballos, ratones, ratas, hámsters, cerdos, cerdos enanos, pollos, cabras, vacas, ovejas, perros, gatos, primates no humanos y seres humanos. En realizaciones preferidas, el huésped puede ser un ratón, conejo, cabra, cobaya, pollo, rata, hámster, cerdo, oveja, perro o gato. El huésped puede ser un mamífero. En las realizaciones más preferidas, el huésped puede ser un ser humano.

- 15 Habiendo descrito generalmente la invención, la misma se entenderá con más facilidad haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: generación de pScNHSA

20 El vector pScNHSA (número de depósito en la ATCC PTA-3279) es un derivado de pPPC0005 (número de depósito en la ATCC PTA-3278) y se usa como un vector de clonación dentro del que los polinucleótidos que codifican una proteína terapéutica o un fragmento o variante de la misma se insertan adyacentes a y en fase de traducción con polinucleótidos que codifican seroalbúmina humana "HSA". pScNHSA se puede usar para generar fusiones de HAS-proteínas terapéuticas.

#### Generación de pScNHSA: fusión de albúmina con el resto de albúmina N-terminal a la parte terapéutica.

25 Un vector para facilitar clonar ADN que codifica una parte de proteína terapéutica C-terminal al ADN que codifica proteína de albúmina madura, se fabricó añadiendo tres sitios de restricción de ocho pares de bases a pScCHSA. Los sitios de restricción *Asc* I, *Fse* I y *Pme* I se añadieron entre los sitios *Bsu*36 I y *Hind* III al final de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína HSA madura. Esto se llevó a cabo por el uso de dos cebadores de síntesis complementarios que contienen los sitios de restricción *Asc* I, *Fse* I y *Pme* I subrayados (SEC ID N.º: 1043 y SEC ID N.º: 1044). 5'-AAGCTGCCTTAGGCTTATAATAAGGCGCGCCGGCCGGCCGTTTAAACTAAGCT TAATTGT-3' (SEC ID N.º: 1043) y

30 5-AGAATTAAGCTTAGTTTAAACGGCCGGCCGGCGCGCCTTATTATAAGCCTAAG GCAGCTT-3' (SEC ID N.º: 1044). Estos cebadores se fusionaron y digirieron con *Bsu*36 I y *Hind* III y se ligaron en los mismos sitios en pScCHSA creando pScNHSA.

- 35 **Ejemplo 2: generación de construcciones generales para la transformación de levaduras.**

El vector pScNHSA se puede usar como un vector de clonación dentro del que los polinucleótidos que codifican una proteína terapéutica o un fragmento o una variante de la misma se insertan adyacentes a polinucleótidos que codifican seroalbúmina humana madura "HSA". pScNHSA se puede usar para generar fusiones de HSA-proteínas terapéuticas.

40 Generación de construcciones de fusión de albúmina que comprenden productos de fusión HSA-proteína terapéutica

El ADN que codifica una proteína terapéutica (por ejemplo, secuencias mostradas en SEC ID N.º: X o conocidas en la técnica) se pueden amplificar usando los cebadores que facilitan la generación de una construcción de fusión (por ejemplo, que añaden sitios de restricción, que codifican fusiones continuas, que codifican secuencias de engarce, etc.) Por ejemplo, un experto en la técnica podría diseñar un cebador 5' que añade polinucleótidos que codifican los cuatro últimos aminoácidos de la forma madura de HSA (y que contienen el sitio *Bsu*361) en el extremo 5' del ADN que codifica una proteína terapéutica; y un cebador 3' que añade un codon de parada y sitios de clonación apropiados en el extremo 3' de la secuencia que codifica proteína terapéutica. Por ejemplo, el cebador de delante usado para amplificar ADN que codifica una proteína terapéutica puede tener la secuencia 5'-aagctGCCTTAGGCTTA(N)<sub>15</sub>-3' (SEC ID N.º: 1045) donde la secuencia subrayada es un sitio *Bsu*361, los nucleótidos escritos con mayúscula codifican los últimos cuatro aminoácidos de la proteína HSA madura (ALGL) y (N)<sub>15</sub> es idéntica a los primeros 15 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. De forma similar, el cebador inverso usado para amplificar ADN que codifica una proteína terapéutica puede tener la secuencia

5'-GCGCGCGTTTAAACGGCCGGCCGGCGCGCCTTATTATA(N)<sub>15</sub>-3'

SEC ID N.º: 1046) donde la secuencia en cursiva es un sitio *Pme* I, la secuencia subrayada doblemente es un sitio *Fse* I, la secuencia subrayada individualmente es un sitio *Asc* I, los nucleótidos en cajas son el complemento reverso de dos codones de parada en tándem y (N)<sub>15</sub> es idéntico al complemento reverso de los últimos 15 nucleótidos que codifican la proteína terapéutica de interés. Una vez se amplifica el producto de PCR ello puede cortarse con *Bsu*36I y uno de (*Asc* I, *Fse* I, o *Pme* I) y ligarse en pScNHSA.

La presencia del sitio *Xho* I en la secuencia líder quimérica de HSA crea un cambio de un aminoácido individual en el extremo de la secuencia señal quimérica, es decir la secuencia señal quimérica HSA-kex2, de LDKR (SEC ID N.º: 2139) a LEKR (SEC ID N.º: 2140).

Generación de construcción de fusión de albúmina compatible para expresión en levadura *S. cerevisiae*.

El fragmento *Not* I que contiene el ADN que codifica un proteína de fusión de albúmina N-terminal generada a partir de pScNHSA puede clonarse después dentro del sitio *Not* I de pSAC35 que tiene un marcador seleccionable LEU2. El vector resultante se usa después en la transformación de un sistema de expresión de levadura *S. cerevisiae*.

**Ejemplo 3: expresión general en *S. cerevisiae* de levaduras.**

Un vector de expresión compatible con expresión en levaduras puede transformarse en *S. cerevisiae* de levaduras por transformación de acetato de litio, electroporación u otros procedimientos conocidos en la técnica y o según se describen en parte en Sambrook, Fritsch y Maniatis. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition", volúmenes 1-3 y en Ausubel et al. 2000. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School "Current Protocols in Molecular Biology", volúmenes 1-4. Los vectores de expresión se introducen dentro de las cepas de *S. cerevisiae* DXY1, D88, o BXP10 por transformación, los transformantes individuales se pueden cultivar, por ejemplo, durante 3 días a 30 °C en 10 ml de YEPD (extracto de levaduras al 1 % p/v, peptona al 2 % p/v, dextrosa al 2 % p/v) y las células se pueden recoger en fase estacionaria después de 60 horas de crecimiento. Se recogen los sobrenadantes aclarando células a 3000 g durante 10 minutos.

pSAC35 (Sleep et al., 1990, Biotechnology 8:42 y véase Figura 3) comprende, además del marcador seleccionable de LEU2, el plásmido de 2 µm de levadura completo para proporciona funciones de replicación, el promotor PRB1 y la señal de terminación de ADH1.

**Ejemplo 4: pacificación general de la proteína de fusión de albúmina expresada a partir de una fusión de albúmina en levadura *S. cerevisiae*.**

Proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden la forma madura de HSA condensada al extremo N-terminal de la forma madura de una proteína terapéutica (por ejemplo, la forma madura de una proteína terapéutica enumerada en la tabla 1, o la forma madura de una proteína terapéutica mostrada en la tabla 2 como SEC ID N.º: Z). Proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden adicionalmente una secuencia señal que dirige al polipéptido de fusión naciente en las rutas secretoras del huésped usado para expresión. En una realización preferida, el péptido señal codificado por la secuencia señal se retira y la proteína de fusión de albúmina madura se segrega directamente en el medio de cultivo. En las realizaciones preferidas, las proteínas de fusión comprenden generalmente un residuo de metionina. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, que incluyen fragmentos y/o variantes, están también abarcados por la invención.

Las proteína de fusión de albúmina expresadas en levadura como se describe anteriormente se pueden purificar en una escala pequeña sobre una columna de afinidad peptídica Dyax como sigue. La levadura sobrenadante que expresa una proteína de fusión de albúmina se diafiltró frente a tampón fopafato 3 mM pH 6,2, NaCl 20 mM y Tween 20 al 0,01 % para reducir el volumen y para retirar los pigmentos. La solución se filtró después a través de un dispositivo de 0,22 µm. El filtrado se cargó sobre una columna de afinidad de péptido Dyax. La columna se eluyó con tampón Tris 100 mM/HCl, pH 8,2. Las fracciones de pico que contienen se recogen y analizan en SDS-PAGE después de concentrar 5 veces.

Para purificación a gran escala, se puede utilizar el siguiente procedimiento. El sobrenadante en exceso de 2 l se diafiltra y se concentra a 500 ml en Tris 20 mM/HCl pH 8,0. La solución de proteína concentrada se carga sobre una columna de flujo rápido de DEAE-Sefarosa de 50 ml preequilibrada, la columna se lava y la proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl desde NaCl 0 hasta NaCl 0,4 M en Tris 20 ml/HCl, pH 8,0. Esas fracciones que contiene la proteína se reúnen, se ajustan a pH 6,8 con fosfato de sodio 0,5 M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Se añade una concentración final de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,9 M a la solución de proteína y la solución completa se carga en una columna Butyl650S de 50 ml pre-equilibrada. La proteína se eluye con un gradiente lineal de sulfato de amonio (0,9 a 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Aquellas fracciones con la fusión de albúmina se reúnen de nuevo, se diafiltran frente a tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM/ácido cítrico pH 5,75 y se cargan sobre una columna de flujo rápido SP-Sefarosa pre-equilibrada de 50 ml. La proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 0,5 M. Las fracciones que contienen la proteína de interés se combinan, el tampón se cambia a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM/ácido cítrico pH 6,25 con un concentrador de Amicon, la conductividad es < 2,5 mS/cm. Esta solución proteica se carga sobre una columna de alta resolución Q-Sefarosa pre-equilibrada de 15 ml, la columna se lavó y la proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 0,15 M. La proteína purificada se puede formular después en una composición tampón específica por intercambio de tampón.

**Ejemplo 5: Generación de construcción general para la transfección en células de mamífero.**Generación de la construcción de fusión de albúmina compatible para la expresión en líneas celulares de mamífero.

Las construcciones de fusión de albúmina se pueden generar en vectores de expresión para su uso en sistemas de cultivo de células de mamífero. El ADN que codifica una proteína terapéutica se pueden clonar en el extremo N y el extremo C con HSA en un vector de expresión de mamífero mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica (p. ej., amplificación por PCR, digestión de restricción y ligación). Una vez que el vector de expresión se ha construido se puede proceder a la transfección en un sistema de expresión en mamíferos. En la técnica se conocen vectores de expresión adecuados incluyendo, entre otros, por ejemplo, el vector pC4 y/o vectores disponibles en Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH).

El ADN que codifica seroalbúmina humana se ha clonado en el vector pC4 que es adecuado para los sistemas de expresión en mamíferos, creando el plásmido pC4:HSA (número de depósito en la ATCC PTA-3277). Este vector tiene un gen de la dihidrofolato reductasa "DHFR" que permitirá la selección en presencia de metotrexato.

El vector pC4:HSA es adecuado para la expresión de proteínas de fusión de albúmina en células CHO. Para la expresión en otros sistemas de cultivo celular en mamíferos, puede ser deseable subclonar un fragmento que comprende o, como alternativa, que consiste en, ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina en un vector de expresión alternativo. Por ejemplo, un fragmento que comprende, o, como alternativa, que consiste en, ADN que codifica una proteína de fusión madura se puede subclonar en otro vector de expresión, incluidos, entre otros, cualquiera de los vectores de expresión de mamíferos descritos en el presente documento.

En una realización preferida, el ADN que codifica una construcción de fusión de albúmina se subclona en vectores proporcionados por Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH) mediante procedimientos conocidos en la técnica para la expresión en células NS0.

Generación de construcciones de fusión de albúmina que comprenden productos de fusión HSA-proteína terapéutica.

Usando pC4:HSA (número de depósito en la ATCC PTA-3277), se pueden generar construcciones de fusión de albúmina en las que la porción de proteína terapéutica está en el extremo C de la secuencia de albúmina madura. Por ejemplo, se puede clonar ADN que codifica una proteína terapéutica del fragmento o variante de la misma entre los sitios de restricción *Bsu* 36I y *Asc* I del vector. Cuando se clona en *Bsu* 36I y *Asc* I, se puede usar el mismo diseño de cebador usado para clonar en el sistema de vector de levadura (SEC ID N° 1045 y 1046) (véase el ejemplo 2).

**Ejemplo 6. Expresión general en líneas celulares de mamífero.**

Una construcción de fusión de albúmina generada en un vector de expresión compatible con la expresión en líneas celulares de mamífero se puede transfectar en líneas celulares adecuadas mediante precipitación en fosfato cálcico, lipofectamina, electroporación u otros procedimientos de transfección conocidos en la técnica y/o como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición" y en Ausubel et al. 2000. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School "Current Protocols in Molecular Biology", volúmenes 1 -4. Las células transfectadas se seleccionan después mediante la presencia de un agente de selección determinado mediante el marcador seleccionable en el vector de expresión.

El vector de expresión pC4 (n.º de acceso en la ATCC 209646) es un derivado del plásmido pSV2-DHFR (nº de acceso en la ATCC 37146). pC4 contiene repeticiones terminales largas "LTR" del virus del sarcoma de Rous (Cullen et al., March 1985, Molecular and Cellular Biology, 438 - 447) and a fragment of the CytoMegatoVirus "CMV"-enhancer (Boshart et al. 1985, Cell 41: 521 - 530). El vector también contiene el intrón en 3', la señal de poliadenilación y de terminación del gen de la preproinsulina de rata y el gen de la DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano del SV40. Para la transfección se usan células de ovario de hámster chino "CHO" u otras líneas celulares que caecen de un gen de la DHFR activo. La transfección de una construcción de fusión de albúmina en pC4 en las células CHP mediante procedimientos conocidos en la técnica permitirá la expresión de la proteína de fusión de albúmina en células CHO, seguido de la escisión de la secuencia líder y la secreción al sobrenadante. La proteína de fusión de albúmina se purifica después del sobrenadante.

El vector de expresión pEE12.1 es suministrado por Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH) y es un derivado de pEE6 (Stephens and Cockett, 1989, Nucl. Acids Res. 17: 7110). Este vector comprende un promotor, un potenciador y la región no traducida en 5' completa del gen temprano inmediato mayor del citomegalovirus humano "hCMV-MIE" (publicación internacional n° WO89/01036), cadena arriba de una secuencia de interés y un gen de la glutamina sintasa (Murphy et al., 1991, Biochem J. 227: 277279; Bebbington et al., 1992, Bio/Technology 10:169175; patente de EE.UU. 5.122.464) para los fines de selección de células transfectadas en medio selectivo que contiene metionina sulfoximina. La transfección de las construcciones de fusión de albúmina en pEE12.1 en las células NS0 (publicación internacional n° WO86/05807) mediante procedimientos conocidos en la técnica permitirá la expresión de la proteína de fusión de albúmina en células NS0, seguido de la escisión de la secuencia líder y la secreción al sobrenadante. Después, la proteína de fusión de albúmina se purifica del sobrenadante usando técnicas descritas

en el presente documento o, por otro lado, conocidas en la técnica.

La expresión de una proteína de fusión de albúmina se puede analizar mediante, por ejemplo, SDS-PAGE y transferencia Western, análisis de HPLC de fase inversa u otros procedimientos conocidos en la técnica.

5 Las líneas celulares CHO y NS0 estables transfectadas con construcciones de fusión de albúmina generadas mediante procedimientos conocidos en la técnica (p. ej., transfección en lipofectamina) y seleccionadas con, por ejemplo, metotrexato 100 nM por vectores que tienen el gen de la dihidrofolato reductasa 'DHFR' como marcador seleccionable o mediante el crecimiento en ausencia de glutamina. Los niveles de expresión se puede encaminar mediante, por ejemplo, inmunotransferencia, principalmente, con un suero anti-HSA como anticuerpo primario o, en segundo lugar, con suero que contiene anticuerpos dirigidos a la porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión de albúmina como anticuerpo primario.

10 Los niveles de expresión se examinan mediante detección con inmunotransferencia con suero anti-HSA como anticuerpo primario. Las tasas de productividad específicas se determinan mediante ELISA, en el que el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo monoclonal hacia la porción de proteína terapéutica de la proteína de fusión de albúmina y el anticuerpo de detección puede ser el anticuerpo monoclonal anti-HS—biotinilad (o *vice versa*), seguido de unión de peroxidasa de rábano/estreptavidina y análisis de acuerdo con el protocolo del fabricante.

#### **Ejemplo 7. Purificación general de una proteína de fusión de albúmina de una construcción de fusión de albúmina en líneas celulares de mamífero**

20 Las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden la forma madura de HSA fusionada con el extremo N o C de la forma madura de una proteína terapéutica o porciones de la misma (p. ej., la forma madura de una proteína terapéutica indicada en la tabla 1 o la forma madura de una proteína terapéutica mostrada en la tabla 2 como SEC ID N° Z). En una realización de la invención, las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden además una secuencia señal que dirige el polipéptido de fusión naciente en las vías secretoras del huésped usado para la expresión. En una realización preferida, el péptido señal codificado por una secuencia señal se elimina y la proteína de fusión de albúmina madura se secreta directamente al medio de cultivo. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención comprenden, preferentemente, secuencias señal heterólogas (p. ej., la secuencia señal no nativa de una proteína terapéutica concreta), incluyendo, entre otras, MAF, INV, Ig, Fibulina B, Clusterina, proteína 4 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina, variante de las secuencias líder de la HSA, incluyendo, entre otros, una secuencia líder de HSA/MAF quimérica y otras secuencias señal heterólogas conocidas en la técnica. Especialmente preferidas como dichas secuencias señal enumeradas en la tabla 2 y/ la secuencia señal indicada en la sección "Expresión de proteínas de fusión" y/o "Procedimientos adicionales de producción sintética y recombinante de proteínas de fusión de albúmina" de la memoria que se indican anteriormente. En realizaciones preferidas, las proteínas de fusión de la invención comprenden además un residuo de metionina en el extremo N. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluidos fragmentos y/o variantes, también entran dentro de la invención.

35 Las proteínas de fusión de albúmina de sobrenadantes de líneas celulares de mamífero se purifican de acuerdo con diferentes protocolos en función del sistema de expresión usado.

#### Purificación de líneas celulares CHO y 293T

40 La purificación de una proteínas de fusión de albúmina de sobrenadante de células CHO o de sobrenadante de células 293T transfectadas de forma transitoria puede implicar la captura inicial con una resina HQ aniónica usando un tampón de fosfato sódico y una elución por gradiente de fosfato, seguido de cromatografía de afinidad en una columna Blue Sepharose FF usando una elución de gradiente de sales. La Blue Sepharose FF elimina los principales contaminantes BSA/fetuina. Otra purificación sobre la resina Poros PI 50 con un gradiente de fosfato puede eliminar y reducir la contaminación de endotoxina, así como el concentrado de la proteína de fusión de albúmina.

#### Purificación de la línea celular NS0

La purificación de una proteína de fusión de albúmina del sobrenadante de células NS0 puede implicar cromatografía de intercambio aniónico Q-Sepharose, seguida de purificación en SP-sepharose con una etapa de elución, seguida de purificación en Phenyl-650M con una etapa de elución y en última instancia, diafiltración.

Después, la proteína purificada se puede formular mediante intercambio en tampón.

#### **50 Ejemplo comparativo 11: construcción ID 1642, GCSF-HSA, generación.**

Construcción ID 1642, pSAC35:GCSF.T31-P204:HSA, comprende ADN que codifica una proteína de fusión GCSF albúmina que tiene la secuencia líder quimérica de HSA, es decir, el péptido señal HSA-kex2, la forma madura de la "forma corta" del factor estimulador de colonias de granulocitos, "G-CSF", proteína, es decir, T31-P204, condensado al extremo aminoterminal de la forma madura de HSA en el vector de expresión de levadura *S. cerevisiae* pSAC35.

Clonación de ADNc de GCSF

5 Un polinucleótido que codifica GCSF se amplificó por PCR usando cebadores GCSF-1 y GCSF-2, descritos más adelante. El amplímero se cortó con *Sal I/Cla I* y se ligó en pScCHSA cortado con *Xho I/Cla I*. La construcción de número de ID 1642 comprende ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina que contiene la secuencia líder quimérica de HSA, la forma madura de GCSF, seguida por la proteína de HSA madura.

Dos oligonucleótidos adecuados para amplificación de PCR de un polinucleótido codificando la forma madura de GCSF, G-CSF-1 y GCSF-2, se sintetizaron:

GCSF-1: 5'-GAATTCTCGACAAAAGAACCCCCCTGGGCCCTGCCAG-3' (SEC ID N.º: 665)

10 GCSF-2: 5'-AAGCTTATCGATGAGCAACCTCACTCTTGTGTGCATCGGGCTGGGC AAGGTGGCGTAG-3' (SEC ID N.º: 666)

15 GCSF-1 incorpora el sitio de clonación *Sal I* (mostrado subrayado), los nucleótidos que codifican los tres últimos residuos de aminoácidos de la secuencia líder quimérica de HSA, así como 20 nucleótidos que codifican los primeros 6 residuos de aminoácidos de la forma madura de GCSF. En GCSF-2, el sitio *Cla I* (mostrado subrayado) y el ADN que los sigue son el complemento reverso del ADN que codifica los 10 primeros aminoácidos de la proteína HSA madura (SEC ID N.º: 1038) y los 21 últimos nucleótidos son el complemento reverso del ADN que codifica los últimos 7 residuos aminoácidos de GCSF. Usando estos cebadores, un amplímero de PCR se generó, se purificó, se digirió con enzimas de restricción *Sal I* y *Cla I* y se clonó en los sitios *Xho I* y *Cla I* del vector pScCHSA. Después de que la secuencia se confirmó, el fragmento *Not I* que contiene el casete de expresión de fusión de GCSF albúmina se subclonó en pSAC35 cortado con *Not I*.

20 Adicionalmente, análisis del extremo N-terminal de la proteína de fusión de albúmina expresada por secuenciación de aminoácidos confirmó la presencia de la secuencia de GCSF esperada (véase más adelante).

Expresión y purificación de construcción ID 1642.Expresión en levadura *S. cerevisiae*.

25 Se llevó a cabo transformación de la construcción 1642 en cepas de levadura *S. cerevisiae* D88, BXP10 y DXY1 —un mutante de YAP3—, por procedimientos conocidos en la técnica (véase ejemplo 3). Un "ensayo de halo" preliminar se llevó a cabo para valorar si las levaduras transformadas están produciendo las proteínas expresadas por las construcciones de fusión. La secreción de proteínas de fusión de HAS en medios de agar que contienen anticuerpos anti-HSA dará como resultado la formación de un anillo de "precipitina" insoluble o halo. El tamaño del halo es proporcional a la cantidad de proteína HSA que se produce. LEU2 + protótrofos se seleccionaron en medio de abandono de leucina completo sintético que contiene dextrosa, "SCD-Leu". Las colonias seleccionadas así como un control positivo se contaron en rejilla sobre una placa BMMD conteniendo un anticuerpo anti-HSA. Después de cultivar, las placas se incubaron a 4 °C para permitir formación de anillo de precipitina. En base al "ensayo de halo", la transformación de colonias de construcción 1642 produjo proteína. Para determinar el grado de secreción, las células transformadas se recogieron en fase estacionaria después de 48 horas de crecimiento en suspensión. Se recogieron sobrenadantes aclarando células a 3000 g durante 10 minutos. Los niveles de expresión se examinaron por detección por inmunotransferencia con suero anti-HAS (Kent Laboratories) o con un anticuerpo dirigido a la parte de proteína terapéutica, es decir, GCSF, de la proteína de fusión de albúmina. La proteína de fusión de albúmina de GCSF de peso molecular aproximado de 88 kDa se obtuvo. Para obtener cantidades prácticas para purificación, los transformantes de levadura se inocularon en 1 l de medios BMM a 150 rpm, 29,5 °C. El cultivo se centrifugó y se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 m. Las tasas de productividad específica se pueden determinar por medio de ELISA en el que, por ejemplo, el anticuerpo de captura es el anti-GCSF de ratón monoclonal de R&D Systems Clone 3316.111, el anticuerpo de detección es el anticuerpo anti GCSF humano de cabra biotinilado de R&D Systems BAF214 (es decir, clon ACN030081), el conjugado es peroxidasa de rábano picante/estreptavidina (Vector Laboratories, número SA-5004) y el sustrato es Sustrato Peroxidasa KPL TMB (KPL número 50-76-01), donde el análisis se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo de los fabricantes y/o por procedimientos conocidos en la técnica.

Purificación de sobrenadantes de células de levadura *S. cerevisiae*.

Un procedimiento de purificación general para proteínas de fusión de albúmina se ha descrito en el ejemplo 4. La purificación de proteína de fusión de albúmina GCSF se describe específicamente más adelante.

50 Etapa 1: cromatografía de flujo rápido de fenilo (Amersham Pharmacia Biotech)

55 El sobrenadante de cultivo de levadura (3 l) que contiene GCSF-HSA codificada por construcción 1642 se cargó sobre una columna de flujo rápido de fenilo con 1 M de sulfato de amonio en Tris 50 mM, pH 7,2. La columna se lavó con 1 M de sulfato de amonio en Tris 50 mM, pH 7,2, sulfato de amonio 0,2 M en Tris 50 mM, pH 7,2 y después se lavó con el tampón. La proteína de fusión GCSF-HSA se eluyó con agua (agua destilada Agua Para Inyección WFI).

*Etapa 2: cromatografía de flujo rápido SP (Amersham Pharmacia Biotech)*

El eluato de etapa 1 se mezcló con un volumen igual de una solución compuesta de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,3 mM y ácido cítrico 4,85 mM, pH 5,0. La mezcla se cargó a 300 cm/hora sobre una columna de flujo rápido SP y se eluyó con una solución compuesta de NaCl 0,5 M en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 103 mM y ácido cítrico 4,85 mM, pH 5,0. La columna se retiró después con una solución compuesta de NaCl 1 M en Na<sub>2</sub>BPO<sub>4</sub> 10,3 mM y ácido cítrico 4,85 mM, pH 5,0.

*Etapa 3: cromatografía de HIC metilo (BioRad)*

El eluato de etapa 2 se valoró a una concentración final de sulfato de amonio 1 M (143 mS) en Tris 50 mM, pH 7,2 y se cargó en columna HIC de metilo. La columna se lavó hasta un punto de partida, después se lavó con sulfato de amonio 0,6 M en Tris 50 mM, pH 7,2. Se inició un gradiente desde sulfato de amonio 0,6 M hasta sulfato de amonio 0 M. La columna se retiró finalmente con WFI y NaOH 0,5 M. Un lote de impurezas en la muestra eluyó a las concentraciones de sulfato de amonio más bajas orioircionando de este modo la pureza alta de fusión GCSF-HAS.

*Etapa 4: : cromatografía de flujo rápido de CM (Amersham Pharmacia Biotech)*

El eluato de la etapa 3 se diluyó con WFI a 5 mS, pH 5,5 y se cargó sobre la columna CM a 300 cm/hora. La columna se eluyó con NaCl 0,5 M en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11 mM y ácido cítrico 4 mM, pH 5,5. La columna se retiró con NaCl 1 M en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11 mM y ácido cítrico 4 mM, pH 5,5.

*Etapa 5: ultrafiltración/diafiltración (Amersham Pharmacia Biotech)*

El producto purificado se ultrafiltró y diafiltró en solución salina tamponada con fosfato "PBS", pH 7,2.

La proteína de fusión de albúmina GCSF purificada codificada por construcción 1642 se analizó por pureza sobre SDS/PAGE. Estaba > 95 % pura. La proteína se secuenció se confirmó y también mostró pureza al 90 % en secuenciación N-terminal con una secuencia N-terminal de "TPLGP" (SEC ID N.º: 2144).

*La actividad de GCSF se puede someter a ensayo, usando un ensayo de proliferación de células NFS-60 in vitro.**Procedimiento*

Para valorar actividad de GCSF, se emplearon células NSF-60, una línea celular dependiente de factor mioide derivada de tumor inducido por virus ecotrópico silvestre Primary Lake Cascitus.

25 *Cultivo y preparación celulares*

Las células se sembraron originalmente en matraces de T-75 cm<sup>2</sup> a aproximadamente 1,5 x 10<sup>4</sup> células/ml en medios de cultivo (RPMI 1640 conteniendo suero bovino fetal al 10 %, "FBS", penicilina/estreptomicina 1x, L-glutamina 1x (concentración final de 2 mM) e interleucina-3 murina recombinante, (IL3) a 30 ng/ml). Las células se separan por todas partes desde 1:10 hasta 1:20 cada 2 días y se resiembran en medio recién preparado.

30 *Bioensayo de NFS-60*

El ensayo de NFS-60 se lleva a cabo como se describe por Weinstein *et al.* (Weinstein *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 83, páginas 5010-4). Brevemente, el día antes de que se lleve a cabo el ensayo, las células se resembraron a 1,0 x 10<sup>5</sup> en medio de crecimiento de ensayo recién preparado conteniendo IL3. Al día siguiente las células se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml, se centrifugaron a velocidades lentas y se lavaron dos veces en RPMI puro sin suero o factores de crecimiento. El sedimento se resuspende en 25 ml y las células se sонтaron subsiguientemente. Las células se centrifugan una vez más y se resuspenden a la concentración de trabajo en medio de cultivo (descrito anteriormente) pero careciendo de IL3. Las células se plaquearon en placas tratadas con TC de fondo redondo de 96 pocillos a 1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo. Dosis crecientes de GCSF se añadieron a cada pocillo a un volumen final de 0,1 ml. El ensayo se llevó a cabo por triplicado. Las células se cultivaron durante 24 horas para determinar el nivel de proliferación celular. Se añadió <sup>3</sup>H-timidina (5 µCi/ml) 4 horas antes de la terminación del experimento. Las células se recogieron después en filtros de fibra de vidrio usando un recolector de células y la cantidad de ADN marcado con <sup>3</sup>H-timidina se contó usando TOP-Count.

*La actividad de fusión de GCSF albúmina codificada por construcción de número de ID 1642 se puede someter a ensayo usando un ensayo de proliferación de células NFS-60 in vitro.*45 *Procedimiento*

Se puso a prueba la proteína de fusión GCSF albúmina codificada por la construcción 1642 en el bioensayo de proliferación *in vitro* de células NFS-60 descrito anteriormente.

*Cultivo y preparación celulares*

Las células se prepararon como se describe anteriormente.



*Bioensayo de NFS-60*

El día antes de que se llevase a cabo el ensayo, las células se sembraron a  $1,0 \times 10^5$  en medio de crecimiento de ensayo recién preparado conteniendo IL3. Al día siguiente las células se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml, se centrifugaron a velocidades bajas y se lavaron dos veces en RPMI puro sin suero o factores de crecimiento. El sedimento se resuspendió en 25 ml y las células se contaron subsiguientemente. Las células se centrifugaron una vez más y se resuspendieron a la concentración de trabajo en medio de crecimiento (descrito anteriormente) pero careciendo de IL3. Las células se plaquearon en placas tratadas con TC de fondo redondo de 96 pocillos a  $1 \times 10^5$  células/pocillo. Las dosis crecientes bien de HSA, bien de GCSF humano recombinante (rhGCSF), o bien de una proteína de fusión GCSF albumina parcialmente purificada a partir del sobrenadante de levadura, se añadieron a pocillos individuales a un volumen final de 0,1 ml. El ensayo se hizo por triplicado. Las células se cultivaron durante 24 horas para determinar el nivel de proliferación celular. Se añadió  $^3\text{H}$ -timidina (5 Ci/ml) 4 horas antes de la terminación del experimento. Las células se recogieron después en filtros de fibra de vidrio usando recolector celular y la cantidad de ADN marcado con  $^3\text{H}$ -timidina se contó usando TOP-Count.

*Resultados*

La construcción 1642 demostró actividad de proliferación de células NFS-60 en una manera dependiente de dosis, mientras que el sobrenadante de control de levadura que expresa HSA sola no produjo actividad alguna (véase Figura 3).

*La actividad de GCSF puede someterse a ensayo in vivo usando ratones C57BL/6:**GCSF como un agente de movilización.*

G-CSF es capaz de movilizar granulocitos a la periferia así como de incrementar el recuento de glóbulos blancos totales (WBC) cuando se administra a ratones. GCSF humano recombinante, (rhGCSF), se somete a reacción cruzada con el GCSF murino recombinante, (nmGCSF).

*Procedimientos*

Los ratones se marcan en las orejas antes de comenzar las inyecciones. Los ratones se inyectan intraperitonealmente con rhGCSF (Neupogen, AMEN) bien con 5 g (n = 5) o bien con 10 g (n = 5) dos veces al día durante 7 días consecutivos. Los ratones de control (n = 3) recibieron solución salina tamponada con Hepes, (HBSS). A 24 horas después de la última administración de rhGCSF, se extrae sangre periférica del rabo y se analiza con respecto al contenido de granulocitos y al recuento de WBC totales.

*Resultados*

Ambas dosis de rhGCSF incrementan eficientemente tanto la frecuencia como el número total de granulocitos así como el recuento WBC totales (véase Figura 4). Este efecto es patente después de 24 horas de la administración intraperitoneal de rhGCSF final. Este efecto es transitorio y el número de granulocitos volvió a valores normales en el día 5.

*La actividad de proteína de fusión de GCSF albúmina codificada por construcción de número de ID 1642 puede someterse a ensayo in vivo usando ratones C57BL/6: GCSF-HSA como un agente de movilización.*

*Procedimientos*

La proteína de fusión de GCSF albúmina codificada por construcción 1642 puede ensayarse de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Brevemente, los ratones se marcan en las orejas antes de que comiencen las inyecciones. Los ratones se inyectan intraperitonealmente bien con rhGCSF, como un control, o la proteína de fusión de albúmina bien a 5 g (n = 5) o bien a 10 g (n = 5) dos veces al día durante 7 días consecutivos. Los ratones control adicionales (n = 3) están para recibir solución salina tamponada con Hepes, "HBSS". A 24 horas después de la última administración de GCSF, se puede extraer sangre periférica del rabo y se puede analizar para el contenido de granulocitos y para el recuento de WBC totales.

**Ejemplo 8: construcción ID 1643, HSA-GCSF, generación.**

La construcción ID 1643, pSAC35:HSA.GCSF.T31-P204, comprende ADN que codifica una proteínas de fusión de albúmina de GCSF que tiene la proteína HAS de longitud total que incluye la secuencia líder química de HSA de longitud total, es decir, el péptido señal de HSA-kex2, condensado al extremo aminoterminal de la forma madura de la proteína de GCSF, es decir, A21-T153, en el vector de expresión de levadura *S. cerevisiae* pSAC35.

*Clonación del ADNc de GCSF*

El polinucleótido que codifica GCSF se amplificó por PCR usando cebadores GCSF-3 y GCSF-4, descritos más adelante. El amplímero se cortó con *Bsu* 36I/Asc Iy se ligó en pScNHSA cortado con *Bsu* 36I/Asc. La construcción de número de ID 1643 codifica una proteína de fusión de albúmina conteniendo la secuencia líder química y la

forma madura de HSA y la forma madura de GCSF.

Se sintetizaron dos oligonucleótidos adecuados para amplificación de PCR del polinucleótido que codifica la forma madura de GCSF, GCSF-3 y GCSF-4:

GCSF-3: 5'-AAGCTGCCTTAGGCTTAACCCCTGGGCCCTGCCAG -3' (SEC ID N.º: 667)

5 GCSF-4: 5'-GCGCGCGCGCGCCTCAGGGCTGGGCAAGGTGGCGTAG-3' (SEC ID N.º: 668)

10 GCSF-3 incorpora el sitio de clonación de *Bsu* 36I (mostrado subrayado) y los nucleótidos que codifican los últimos cuatro residuos de aminoácidos de la forma madura de HSA, así como 20 nucleótidos que codifican los primeros 6 residuos aminoácidos de la forma madura de GCSF. En GCSF-4, el sitio de *Asc* I está subrayado y los últimos 24 nucleótidos son el complemento reverso de ADN que codifica los últimos 8 residuos aminoácidos de GCSF. Un amplímero de PCR de HSA-GCSF se generó usando estos cebadores, se purificó, se digirió con enzimas de restricción *Bsu* 36I y *Asc* I y se clonó en los sitios de *Bsu* 36I y de *Asc* I del vector pScNHSA. Después la secuencia se confirmó, el casete de expresión que codifica esta proteína de fusión de albúmina se subclonó en pSAC35 como un fragmento *Not* I.

15 Adicionalmente, el análisis del extremo N-terminal de la proteína de fusión de albúmina expresada por secuenciación de aminoácidos confirmó la presencia de la secuencia de HSA esperada (véase más adelante).

20 Proteínas de fusión de GCSF albúmina de la invención comprenden la forma madura de la HSA, es decir, Asp-25 a Leu-609, condensada al extremo N-terminal de la forma madura de GCSF, es decir, Thr-31 a Pro-204, proteínas de fusión de GCSF albúmina de la invención comprenden adicionalmente una secuencia señal que dirige al polipéptido de fusión naciente en las rutas secretoras del huésped usadas para expresión. En una realización preferida adicional, el péptido señal codificado por la secuencia señal se retira y la proteína de fusión de GCSF albúmina madura se secreta directamente en el medio de cultivo. En realizaciones preferidas adicionales, las proteínas de GCSF de fusión de albúmina de la invención comprenden adicionalmente un residuo de metionina N-terminal. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluyendo fragmentos y/o variantes, están abarcados también por la invención.

25 Expresión y purificación de construcción de ID 1643.

*Expression en levadura S. cerevisiae.*

La transformación de construcción 1643 en levadura *S. cerevisiae* se llevó a cabo por procedimientos conocidos en la técnica (véase ejemplo 3) y como se describe previamente por construcción ID 1642 (véase ejemplo comparativo 1).

30 *Purificación de sobrenadante de células de levadura S. cerevisiae.*

Un procedimiento general para purificación de proteínas de fusión de albúmina se describe en ejemplo 4. El sobrenadante celular que contiene proteína de fusión de GCSF albúmina expresado a partir de construcción de número de ID 1643 en células de *S. cerevisiae* de levaduras se purificó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Otro esquema de purificación se describe en ejemplo comparativo 1.

35 *Etapas 1: flujo rápido de fenilsefarosa (horas), pH 7,2*

40 El sobrenadante de fermentación (3,5 l) se ajustó a 139 mS y pH 7,2 con sulfato de amonio a una concentración final de 1 M en Tris 50 mM, pH 7,2. La columna de fenil sefarosa se cargó a un caudal de 300 cm/hora. La columna se lavó con Tris-HCl 50 mM, pH 7,2. Una serie de eluciones de sal inferiores se ejecutó para retirar proteínas contaminantes seguida por una elución de WFI para eluir la proteína diana. Una tira de NaOH de la columna reveló que una porción significativa de la proteína objetivo no se retiró por los tratamientos anteriores.

*Etapas 2: Mimetic Blue, pH 6,5*

45 La proteína diana eluida se diafiltró con tampón citrato fosfato 20 mM, (CPB), pH 6,5 y se cargó después sobre una columna Mimetic Blue equilibrada previamente con tampón CPB 20 mM, pH 6,5. La columna se lavó con tampón de equilibrio en 10 volúmenes de columna. La mayoría de la proteína diana se eluyó después con un lavado de NaCl 0,2 M. Las soluciones de elución de concentración de sal superiores (NaCl 1 M y 2 M) revelaron alguna proteína diana. Sin embargo, cuando HPLC-SEC se llevó a cabo en estas fracciones la mayoría de la proteína diana se observó en forma de agregados. Esta etapa de purificación dio como resultado pureza > 85 % de la proteína diana.

*Etapas 3: Q HP, pH 6,5*

50 La proteína objetivo se diluyó con CPB 20 mM, pH 6,5 (5 veces) a una conductividad de < 5 mS y se cargó sobre la resina Q HP. Se llevaron a cabo una serie de eluciones, NaCl a 100 mM, 200 mM, 500 mM y 1 M. La proteína diana eluyó con NaCl 100 mM.

*Etapa 4: SP FF, pH 5,5*

La proteína diana se diluyó con CPB 20 mM, pH 5,0 y se ajustó a pH 5,0. La proteína diana se cargo sobre columna de SP Sefarosa FF. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. La proteína contaminante de 45 kDa, un fragmento proteolizado de HSA, no se une a la resina y se observó en el flujo de movimiento continuo de carga (LFT). La proteína objetivo se eluyó en un gradiente superficial de NaCl desde 0-500 mM. La proteína diana eluyó a aproximadamente NaCl 250 mM. La proteína diana se diafiltró en el tampón de carga final de CPB 20 mM, pH 6,5.

Análisis por SDS-PAGE identificó una proteína de 88 kDa con pureza > 95 %. La secuenciación N-terminal resultó en la secuencia principal que es "DAHKS" (SEC ID N.º: 2143) que es el extremo aminoterminal de la foam madura de HSA. La composición de tampón final es CPB 20 mM, pH 6,5. Se purificaron 1,94 mg de proteína a partir de 3,5 litros de sobrenadante del cultivo.

La actividad de fusión GCSF albúmina codificada por construcción de número de ID 1643 se puede ensayar usando un ensayo de proliferación de células NFS-60 in vitro.

*Procedimiento*

La proteína de fusión GCSF albúmina codificada por construcción 1643 se puso a prueba en el bioensayo de proliferación de NFS-60 *in vitro* descrito previamente en ejemplo comparativo 1 bajo encabezados de subsección, "La actividad de GCSF se puede someter a ensayo usando un ensayo de proliferación de células NFS-60 *in vitro*" y "La actividad de fusión GCSF albúmina codificada por construcción de número de identificación 1642 puede someterse a ensayo usando un ensayo de proliferación de células NFS-60 *in vitro*".

*Resultados*

La construcción 1643 demostró la capacidad para causar proliferación de células NFS-60 en una manera dependiente de dosis, mientras el sobrenadante de control con HSA solo no produjo actividad alguna (véase Figura 3).

La actividad de fusión GCSF albúmina codificada por la construcción de número de ID 1643 se puede someter a ensayo in vivo usando ratones C57BL/6: GCSF-HSA como un agente de movilización.

*Procedimientos*

La proteína de fusión GCSF albúmina codificada por construcción 1643 se puede someter a ensayo de acuerdo con el procedimiento como se describe anteriormente en el Ejemplo comparativo 1 bajo los encabezados de subsección, "La actividad de GCSF se puede someter a ensayo *in vivo* usando ratones C57BL/6: GCSF-HSA como un agente de movilización" y "La actividad de fusión GCSF albúmina codificada por construcción de número de identificación 1642 puede someterse a ensayo *in vivo* usando ratones C57BL/6: GCSF-HSA como un agente de movilización".

**Ejemplo 9: indicaciones para proteínas de fusión GCSF albúmina.**

En base a la actividad de proteínas de fusión de GCSF albúmina en los ensayos anteriores, las proteínas de fusión de albúmina son útiles en quimioprotección, tratando, evitando, y/o diagnosticando trastornos inflamatorios, leucemia mielocítica, neutropenias primarias (por ejemplo, síndrome de Kostmann), neutropenia secundaria, prevención de neutropenia, prevención y tratamiento de neutropenia en pacientes infectados por VIH, prevención y tratamiento de neutropenia asociada con quimioterapia, infecciones asociadas con neutropenia, mielodisplasia y trastornos autoinmunes, movilización de células progenitoras hematopoyéticas, trasplante de médula ósea, leucemia mielógena aguda, linfoma no hodkiniano, leucemia linfoblástica aguda, enfermedad de Hodgkin y enfermedad de almacenamiento de glucógeno.

**Ejemplo 10: Aislamiento de un clon de ADNc seleccionado de la muestra depositada**

Muchas de las construcciones de fusión de albúmina de la invención se han depositado con la ATCC como se muestra en la tabla 3. Las construcciones de fusión de albúmina pueden comprender uno cualquiera de los siguientes vectores de expresión: el vector de expresión en la levadura *S. cerevisiae* pSAC35, el vector de expresión en mamíferos pC4 o el vector de expresión en mamíferos pEE12.1.

Los vectores pSAC35 (Sleep et al., 1990, *Biotechnology* 8:42), pC4 (nº de acceso en la ATCC 209646; Cullen et al., *Molecular and Cellular Biology*, 438447 (1985); Boshart et al., *Cell* 41: 521530 (1985)), and pEE12.1 (Lonza Biologics, Inc.; Stephens and Cockett, *Nucl. Acids Res.* 17: 7110 (1989); publicación internacional nº WO89/01036; Murphy et al., *Biochem J.* 227: 277279 (1991); Bebbington et al., 1992, *Bio/Technology* 10:169175 (1992); ; patente de EE.UU. 5.122.464; publicación internacional nº WO86/05807) comprenden un gen de resistencia a ampicilina para el crecimiento en células bacterianas. Estos vectores y/o la construcción de fusión de albúmina que los comprende se pueden transformar en una cepa de *E. coli* tal como Stratagene XL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, Inc., 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037) usando técnicas descritas en la técnica, tal como Hanahan, extensión en placas de agar Luria-Broth que contienen 100 µg/ml de ampicilina y crecimiento durante la

noche a 37°.

El material depositado en la muestra asignada con el número de depósito en la ATCC citado en la tabla 3 para cualquier construcción de fusión de albúmina dada también puede contener una o más construcciones de fusión de albúmina adicionales, codificando cada una diferentes proteínas de fusión de albúmina. Por tanto, los depósitos que comparten el mismo número de depósito en la ATCC contienen al menos una construcción de fusión de albúmina identificada en la correspondiente fila de la tabla 3.

Se pueden usar dos enfoques para aislar una construcción de fusión de albúmina concreta de la muestra depositada de los ADN plasmídicos citados para dicha construcción de fusión de albúmina en la tabla 3.

#### Procedimiento 1: Detección selectiva

Primero, una construcción de fusión de albúmina se puede aislar directamente mediante detección selectiva de la muestra del ADN plasmídico depositado usando una sonda polinucleotídica correspondiente a la SEC ID N° X para un ID n° de construcción individual en la tabla 1, usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede sintetizar un polinucleótido específico con 3040 nucleótidos usando un sintetizador de ADN de Applied Biosystems de acuerdo con la secuencia indicada. El oligonucleótido se puede marcar con, por ejemplo, <sup>32</sup>P-γ-ATP usando la polinucleótido quinasa de Y4 y se purifica de acuerdo con procedimientos de rutina. (p. ej., Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). La construcción de fusión de albúmina de un depósito de la ATCC dado se transforma en un huésped adecuado, como se ha indicado anteriormente (tal como XL-1 Blue (Stratagene)) usando técnicas conocidas para el experto en la técnica, tal como las proporcionadas por el suministrador del vector o en publicaciones o patentes relacionadas citadas anteriormente. Los transformantes se siembran en placas de agar al 1,5 % (que contienen el agente de selección adecuado, por ejemplo ampicilina) hasta una densidad de aproximadamente 150 transformantes (colonias) por placa. Estas placas se someten a detección selectiva usando membranas de nailon de acuerdo con procedimientos rutinarios para detección selectiva de colonias bacterianas (p. ej., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edit., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, páginas 1.93 a 1.104), u otras técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

#### Procedimiento 2: PCR

Como alternativa, el ADN que codifica una proteína de fusión de albúmina dada se puede amplificar de una muestra de una construcción de fusión de albúmina depositada con SEC ID N° X, por ejemplo usando dos cebadores de 1720 nucleótidos que hibrida con la construcción de fusión de albúmina depositada 5' y 3' con el AD que codifica una proteína de fusión de albúmina dada. La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en condiciones de rutina, por ejemplo en 25 μl de la mezcla de reacción con 0,5 μg del molde de ADNc anterior. Una mezcla de reacción conveniente es MgCl<sub>2</sub> 1,55 mM, 0,1 % (p/v) de gelatina, 20 μM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 pmol de cada cebador y 0,25 unidades de la Taq polimerasa. Se realizan treinta y cinco ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 55 °C durante 1 minuto, elongación a 72 °C durante 1 minuto) con un ciclador térmico automático Perkin-Elmer Cetus. El producto amplificado se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y la banda de ADN con el peso molecular previsto se escinde y purifica. El producto de PCR se verifica que es la secuencia seleccionada mediante subclonación y secuenciación del producto de ADN.

Se dispone de varios procedimientos para la identificación de las porciones no codificantes en 5' y 3' de un gen que puede no estar presente en el clon depositado. Estos procedimientos incluyen, entre otros, sondaje con filtro, enriquecimiento del clon usando sondas específicas y protocolos similares o idénticos a los protocolos "RACE" en 5' y 3' que se conocen en la técnica. Por ejemplo, se dispone de un procedimiento similar al RACE en 5' para generar el extremo 5' ausente de un transcrito de longitud completa deseado (Fromont-Racine et al., Nucleic Acids Res., 21(7):1683 - 1684 (1993)).

Brevemente, un oligonucleótido de ARN específico se liga a los extremos 5' de una población de ARN que posiblemente contenga los transcritos de ARN del gen de longitud completa. Un conjunto de cebadores que contienen un cebador específico del oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico de una secuencia conocida del gen de interés se usa para amplificar por PCR la porción en 5' del gen de longitud completa deseado. Este producto amplificado se puede secuenciar después y usar para generar el gen de longitud completa.

Este procedimiento anterior comienza con el ARN total aislado de la fuente deseada, aunque se puede usar poly-A+ARN. La preparación de ARN se puede tratar después con fosfatasa en caso necesario para eliminar los grupos fosfato en 5' sobre ARN degradado o dañado que puede interferir con la última etapa de ARN ligasa. La fosfatasa deberá inactivarse y el ARN tratarse con la pirofosfatasa ácida de tabaco con el fin de eliminar la estructura de capuchón presente en los extremos 5' de los ARN mensajeros. Esta reacción deja un grupo fosfato en 5' en el extremo 5' del ARN sin capuchón que después se puede ligar en un oligonucleótido de ARN usando la ARN ligasa de T4.

Esta preparación de ARN modificado se usa como molde para para la síntesis de la primera hebra del ADNc usando un oligonucleótido específico del gen. La preacción de síntesis de la primera hebra se usa como molde para la amplificación por PCR del extremo 5' deseado usando un cebador específico del oligonucleótido de ARN ligado y un

cebador específico de la secuencia conocida del gen de interés. El producto resultante se secuencia después y analiza para confirmar que la secuencia del extremo 5' pertenece al gen deseado.

#### Ejemplo 11: Ensayo de captación de [<sup>3</sup>H]-2-Desoxiglucosa

5 Los tejidos adiposo, de músculo esquelético y hepático son tejidos sensibles a insulina. La insulina puede estimular la captación/transporte de glucosa en estos tejidos. En el caso de los tejidos adiposo y de músculo esquelético, la insulina inicia la transducción de señal que en última instancia conduce a la translocación de la molécula 4 transportadora de glucosa, GLUT4, desde un compartimento intracelular especializado a la superficie de la célula. Una vez en la superficie de la célula, GLUT4 permite la captación/transporte de glucosa.

##### *Captación de [<sup>3</sup>H]-2-Desoxiglucosa*

10 Se puede usar una serie de líneas celulares relacionadas con los tejidos adiposo y muscular para analizar la actividad de captación/transporte de glucosa en ausencia o presencia de una combinación de uno cualquiera de los fármacos terapéuticos indicados para el tratamiento de la diabetes mellitus. En particular, las células de fibroblastos murinos 3T3-L1 y las células de músculo esquelético murino L6 se pueden diferenciar en adipocitos 3T3-L1 y en miotubos, respectivamente, para servir como modelos *in vitro* adecuados para el ensayo de captación de [<sup>3</sup>H]-2-Desoxiglucosa (Urso et al., J Biol Chem, 274(43): 3086473 (1999); Wang et al., J Mol Endocrinol, 19(3): 2418 (1997); Haspel et al., J Membr Biol, 169 (1): 4553 (1999); Tsakiridis et al., Endocrinology, 136(10): 4315 - 22 (1995)). Brevemente, 2 x 10<sup>5</sup> cells/100 µl de adipocitos o de células L6 diferenciadas se transfieren a placas de cultivo tisular de 96 pocillos, "CT", tratadas, es decir, revestidas, con 50 µg/ml de poli-L-lisina, placas en medio posdiferenciación y se incuban durante la noche a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se lavan primero una vez con medio DMEM con poca glucosa sin suero y después se mantienen con 100 µl/pocillo del mismo medio y con 100 µl/pocillo de tampón o de una combinación de una cualquiera o más de los fármacos terapéuticos enumerados para el tratamiento de la diabetes mellitus, por ejemplo concentraciones crecientes de 1 nM, 10 nM y 100 nM de los agentes terapéuticos de la invención sujeto (p. ej., fusiones específicas divulgadas como la SEC ID N° Y y fragmentos y variantes de las mismas) durante 16 horas a 37 °C en ausencia o presencia de insulina 1 nM. Las placas se lavan tres veces con 100 µl/pocillo de solución salina tamponada HEPES. Se añade insulina a 1 nM en solución salina tamponada HEPES durante 30 min a 37° C en presencia de 10 µM [<sup>3</sup>H]-2-desoxiglucosa marcada 10 µM (Amersham, #TRK672) y 2-desoxiglucosa 10 µM sin marcar (SIGMA, D-3179). Como control se realizan las mismas condiciones a excepción de en ausencia de insulina. Se añade una concentración final de citochalasina B (SIGMA, C6762) a 100 µl/pocillo en un pocillo aparte para medir la captación inespecífica. Las células se lavan tres veces con solución salina tamponada HEPES. Se añaden [<sup>3</sup>H]-2-desoxiglucosa marcada 10 µM sin marcar, es decir 2-desoxiglucosa 10 µM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavan tres veces con solución salina tamponada con fosfato "PBS" fría. Las células se lisan tras la adición de 150 µl/pocillo de NaOH 0,2 N y la posterior incubación con agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, las muestras se transfieren a un vial de centelleo al que se añaden 5 ml de fluido de centelleo. Los viales se cuentan en un contador de centelleo beta. La captación en condiciones de duplicado, siendo la diferencia la ausencia o presencia de insulina, se determina con la ecuación siguiente: [(cuentas de insulina por minuto "cpm" – cpm inespecíficas)/(cpm sin insulina- cpm inespecíficas)]. Las respuestas medias entran dentro de los límites de aproximadamente por 5 y por 3 las de los controles por adipocitos y miotubos.

##### *Diferenciación de células*

40 Se deja que las células lleguen a confluencia completa en un matraz de T-75 cm<sup>2</sup>. Se retira el medio y se sustituye con 25 ml de medio de prediferenciación durante 48 horas. Las células se incuban a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>, 85 % de humedad. Tras 48 horas, se retira el medio de prediferenciación y se sustituye con 25 ml de medio de diferenciación durante 48 horas. Las células se incuban de nuevo a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>, 85 % de humedad. Tras 48 horas, se retira el medio y se sustituye con 30 ml de medio de posdiferenciación. El medio posdiferenciación se mantiene durante 14 - 20 días o hasta que se consigue la diferenciación completa. El medio se cambia cada 2 - 3 días. Los adipocitos humanos se pueden adquirir de Zen-Bio, INC (# SA-1096).

#### Ejemplo 12: Ensayo *in vitro* de incorporación de timidina-[<sup>3</sup>H]- en líneas de células de pancreáticas

50 Recientemente se ha mostrado que GLP-1 induce la diferenciación de la línea celular epitelial ductal pancreática de rata ARIP de un modo dependiente del tiempo y de la dosis, que se asocia con un incremento de la homeocaja 1 duodenal de los islotes (IDX-1) y los niveles de ARNm de insulina (Hui et al., 2001, Diabetes, 50(4): 785 - 96). El IDX-1 aumenta, a su vez, los niveles de ARNm del receptor del GLP-1.

##### *Tipos de células analizados*

55 Células RIN-M: Estas células están disponibles en la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC, número de línea celular CRL-2057). La línea celular RIN-M derivaba de un tumor de células de islotes de rata transplantables inducido por radiación. La línea se estableció a partir de un xenoinjerto del tumor de ratón atímico. Las células producen y secretan hormonas polipeptídicas del islote y producen L-dopa descarboxilasa (un marcador de células que tienen captación del precursor de aminas y descarboxilación, o actividad APUD).

Células ARIP: Estas son células exocrinas pancreáticas de morfología epitelial disponibles en la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC, número de línea celular CRL-1674). Véanse también las referencias: Jessop, N.W. and Hay, R.J., "Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors," *In Vitro* 16: 212, (1990); Cockell, M. et al., "Identification of a cell-specific DNA-binding activity that interacts with a transcriptional activator of genes expressed in the acinar pancreas," *Mol. Cell. Biol.* 9: 24642476, (1989); Roux, E., et al. "The cell-specific transcription factor PTF1 contains two different subunits that interact with the DNA" *Genes Dev.* 3: 16131624, (1989); and, Hui, H., et al., "Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells," *Diabetes* 50: 785 - 796 (2001).

#### Preparación de las células

10 La línea celular RIN-M se cultiva en medio RPMI 1640 (Hyclone, #SH300027.01) con 10 % de suero bovino fetal (HyClone, #SH30088.03) y se subcultiva cada 6 a 8 días a una proporción de 1:3 a 1:6. El medio se cambia cada 3 a 4 días.

15 La línea celular ARIP (n.º en la ATCC CRL-1674) se cultiva en medio F12K de Ham (n.º en la ATCC, 302004) con L-glutamina 2 mM ajustada para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico y 10 % de suero bovino fetal. La línea celular ARIP se subcultiva en una proporción de 1:3 a 1:6 dos veces a la semana. El medio se cambia cada 3 a 4 días.

#### Protocolo del ensayo

20 Las células se siembran a 4.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivan de 48 a 72 horas hasta una confluencia del 50 %. Las células se pasan a medio sin suero a 100 µl/pocillo. Tras incubar durante 48 - 72 horas, al pocillo se añaden sustancias terapéuticas de la invención sujeto (p. ej., proteínas de fusión de albúmina de la invención y fragmentos y variantes de las mismas). La incubación persiste durante 36 horas adicionales. La timidina [<sup>3</sup>H] (520 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia, #TRK120) se diluye hasta 1 microCuries/5 microlitros. Después de una incubación de 36 horas se añaden 5 microlitros por pocillo durante otras 24 horas. La reacción se termina mediante lavado suave de las células con solución salina tamponada con fosfato "PBS" fría una vez. Las células se fijan después con 100 microlitros de 10 % de TCA helado durante 15 minutos a 4 °C. El PBS se elimina y se añaden 200 microlitros de NaOH 0,2 N. Las placas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. La solución se transfiere a un vial de centelleo y se añaden 5 ml de fluido de centelleo compatible con soluciones acuosas y se mezclan enérgicamente. Los viales se cuentan en un contador de centelleo beta. Como control negativo solo se usa tampón. Como control positivo se usa suero bovino fetal.

#### **Ejemplo 13: Ensayo de glucosuria**

30 La glucosuria (es decir, un exceso de azúcar en la orina) se puede determinar fácilmente para proporcionar un índice del estado de la enfermedad de diabetes mellitus. El exceso en orina en una muestra de pacientes en comparación con una muestra normal de un paciente es sintomática de DMDI y de DMNDI. La eficacia del tratamiento de dicho paciente con DMDI y DMNDI viene indicada por una disminución resultante de la cantidad de exceso de glucosa en orina. En una realización preferida para el control de la DMDI y DMNDI, las muestras de orina de pacientes se analizan para determinar la presencia de glucosa usando técnicas conocidas en la técnica. La glucosuria en seres humanos se define por una concentración de glucosa en orina superior a 100 mg por 100 ml. Los niveles excesivos de azúcar en los pacientes que exhiben glucosuria se pueden medir incluso con mayor precisión obteniendo muestras de sangre y analizando la glucosa en suero.

#### **Ejemplo 14: Diabetes en ratones NOD.**

40 Los ratones NOD (diabéticos no obesos) hembra se caracterizan por DMDI con una evolución similar a la hallada en seres humanos, aunque la enfermedad es más pronunciada en ratones NOD hembra que en macho. En lo sucesivo en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, la expresión "ratón NOD" hace referencia a un ratón NOD hembra. Los ratones NOD tienen una destrucción progresiva de las células beta que se debe a una enfermedad autoinmunitaria crónica. Por tanto, los ratones NOD comienzan la vida con euglucemia o niveles normales de glucosa en sangre. Aproximadamente las 15 a 16 semanas de edad, los ratones NOD comienzan a estar hiperglucémicos, lo que indica destrucción de la mayoría de las células beta pancreáticas y la correspondiente incapacidad del páncreas para producir suficiente insulina. Por tanto, tanto la causa como la progresión de la enfermedad son similares a las de los pacientes DMDI humanos.

50 Los ensayos de eficacia *In vivo* de los regímenes de inmunización se pueden evaluar en ratones NOD/LtJ hembra (disponibles comercialmente en The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me.). En la literatura, se ha comunicado que el 80 % de los ratones hembra desarrolla diabetes a las 24 semanas de edad y la insulinitis comienza a las 68 semanas de edad. Los ratones NOD son endogámicos y muy respondedores a diversas estrategias inmunorreguladoras. Los ratones NOD adultos (68 semanas de edad) tienen una masa media de 20 - 25 g.

55 Estos ratones pueden estar sin tratar (control), tratados con las sustancias terapéuticas de la invención sujeto (p. ej., proteínas de fusión de albúmina de la invención y fragmentos y variantes de las mismas), solas o en combinación con otros compuestos terapéuticos indicados anteriormente. El efecto de estos diversos tratamientos sobre la progresión de la diabetes se puede medir del siguiente modo:

5 A las 14 semanas de edad, los ratones NOD hembra se pueden fenotipar de acuerdo con la tolerancia a la glucosa. La tolerancia a la glucosa se puede medir con la prueba de la tolerancia a la glucosa intraperitoneal (Brevemente, se extrae sangre del plexo paraorbital a 0 minutos y a 60 minutos de la inyección intraperitoneal de glucosa (1 g/kg de peso corporal). La tolerancia normal se define como la glucosa en plasma a 0 minutos de menos de 144 mg, %, o a 60 minutos de menos de 160 mg %. Los niveles de glucosa en sangre se miden con un glucosímetro Elite.

Según este análisis fenotípico, se puede asignar a los animales a los diferentes grupos experimentales. En concreto, los animales con niveles de glucosa en sangre más elevados se pueden asignar al grupo de tolerancia a la glucosa alterada. Se puede alimentar a los ratones a demanda y se les puede suministrar agua acidificada (pH 2,3).

10 Los ratones tolerantes e intolerantes a la glucosa se pueden subdividir además en grupos control, de proteínas de fusión de albúmina de la invención sujeto y de combinación de proteínas de fusión de albúmina /compuestos terapéuticos. Los ratones del grupo control pueden recibir una inyección interperitoneal de vehículo al día, seis veces a la semana. Los ratones del grupo de fusión de albúmina pueden recibir una inyección interperitoneal de las sustancias terapéuticas de la invención sujeto (p. ej., las proteínas de fusión de albúmina de la invención y fragmentos y variantes de las mismas) en vehículo diario, seis veces a la semana. Los ratones del grupo de  
15 combinación proteínas de fusión de albúmina / compuestos terapéuticos pueden recibir proteínas de fusión de albúmina y combinaciones de compuestos terapéuticos como se ha descrito anteriormente.

20 EL nivel de glucosa en orina en los ratones NOD se puede determinar dos veces a la semana usando Labstix (Bayer Diagnostics, Hampshire, England). El peso y la ingesta de fluidos también se puede determinar dos veces a la semana. El inicio de la diabetes se define después de la aparición de glucosuria en dos determinaciones consecutivas. Tas 10 semanas de tratamiento, se puede realizar una nueva prueba de IPGTT adicional y se puede sacrificar a los animales al día siguiente.

25 Durante las 10 semanas del tratamiento, los animales control de los grupos tolerantes a glucosa e intolerantes a glucosa desarrollan diabetes a una velocidad del 60 % y 86 %, respectivamente (véase la patente de EE.UU. nº 5.866.546, Gross et al.). Por tanto, se producen altas tasas de diabetes incluso en ratones NOD que eran inicialmente tolerantes a la glucosa si no se realiza ninguna intervención.

Los resultados se pueden confirmar mediante la determinación de los niveles de glucosa en sangre en ratones NOD, antes y después del tratamiento. Los niveles de glucosa en sangre se miden como se ha descrito anteriormente en ratones tanto tolerantes como intolerantes a la glucosa en todos los grupos descritos.

30 En una realización alternativa, las sustancias terapéuticas de la invención sujeto (p. ej., fusiones específicas divulgadas como la SEC ID N° Y y fragmentos y variantes de las mismas) se pueden cuantificar usando análisis espectrométrico y cantidades adecuadas de proteínas se pueden resuspender antes de la inyección en 50 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por dosis. Se pueden administrar dos inyecciones, separadas por una semana, por vía subcutánea debajo de la piel dorsal de cada ratón. La monitorización se puede realizar dos veces separadas antes de la inmunización y se puede realizar semanalmente a lo largo del tratamiento y continuar  
35 después. La orina se puede analizar para determinar la glucosa cada semana (Keto-Diastix.RTM.; Miles Inc., Kankakee, Ill.) y en los ratones glucosúricos se controlarán los niveles de glucosa en suero (ExacTech.RTM., MediSense, Inc., Waltham, Mass.). Se diagnostica diabetes cuando la glucemia en ayunas es superior a 2,5 g/l.

#### **Ejemplo 15: Exploración histológica de ratones NOD.**

40 La exploración histológica de las muestras de tejido de ratones NOD puede demostrar la capacidad de las composiciones de la presente invención y/o la combinación de las composiciones de la presente invención con otros agentes terapéuticos para diabetes, para incrementar la concentración relativa de las células beta en el páncreas. El procedimiento experimental es el siguiente:

45 Se puede sacrificar a los ratones del ejemplo 44 al final del periodo de tratamiento y se pueden tomar muestras de tejido del páncreas. Las muestras se pueden fijar en 10 % de formalina en solución salina al 0,9 % y se incluyen en cera. Se pueden cortar dos conjuntos de 5 secciones µm en serie para inmunomarcaje a un intervalo de corte de 150 µm. Las secciones se pueden inmunomarcar para insulina (dilución 1:1000 de antisuero anti-insulina de cobaya, ICN Thames U.K.) y glucagón (dilución 1:2000 de antisuero anti-glucagón de páncreas de conejo) y se detecta con antisuero de cobaya conjugado con peroxidasa (Dako, High Wycombe, Reino Unido.) o antisuero de conejo conjugado con peroxidasa (dilución a 1:50, Dako).

50 La composición de la presente invención puede o no tener un fuerte efecto sobre la masa visible de las células beta, como sobre las manifestaciones clínicas de la diabetes en animales tolerantes a la glucosa o intolerantes a la glucosa.

#### **Ejemplo 16: Terapia de combinación de trasplantes de células beta pancreáticas.**

55 El trasplante es una forma habitual de tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, especialmente cuando el propio tejido diana se ha visto dañado gravemente. Por ejemplo y no a modo de limitación, el trasplante de páncreas y el trasplante de células de los islotes son opciones terapéuticas para la DMID (véase, por ejemplo, Stewart et al.,

Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86 (3): 984 - 988 (2001); Brunicardi, Transplant. Proc. 28: 2138 - 40 (1996); Kendall & Robertson, Diabetes Metab. 22: 157 - 163 (1996); Hamano et al., Kobe J. Med. Sci. 42: 93 - 104 (1996); Larsen & Stratta, Diabetes Metab. 22: 139 - 146 (1996); and Kinkhabwala, et al., Am. J. Surg. 171: 516 - 520 (1996)). Como ocurre con cualquier procedimiento de trasplante, los tratamientos de trasplantes para pacientes con enfermedades autoinmunitarias incluyen tratamientos para minimizar el riesgo de rechazo del huésped del tejido trasplantado. No obstante, la enfermedad autoinmunitaria implica el riesgo independiente adicional de que la respuesta autoinmunitaria preexistente del huésped que dañó el tejido propio original ejercerá el mismo efecto dañino sobre el tejido trasplantado. De acuerdo con esto, la presente invención abarca procedimientos y composiciones para el tratamiento de enfermedades pancreáticas autoinmunitarias usando las proteínas de fusión de albúmina de la invención sujeto en combinación con inmunomoduladores/inmunosupresores en individuos sometidos a terapia de trasplante de la enfermedad autoinmunitaria.

De acuerdo con la invención, las composiciones basadas en fusión de albúmina y las formulaciones descritas anteriormente se administran para prevenir y tratar los daños en el órgano, tejido o células trasplantadas resultantes de la respuesta autoinmunitaria del individuo huésped dirigida inicialmente contra el tejido propio original. La administración se puede llevar a cabo antes y después del trasplante en de 2 a 4 dosis, separadas cada una por una semana.

Los siguientes inmunomoduladores/inmunosupresores, incluyendo, entre otros, AI-401, CDP-571 (anticuerpo monoclonal anti-TNF), CG-1088, Diamyd (vacuna para la diabetes), ICM3 (anticuerpo monoclonal anti-ICAM-3), linomida (Roquinimex), NBI-6024 (ligando peptídico alterado), TM-27, VX-740 (HMR-3480), inhibidores de la caspasa 8 proteasa, talidomida, hOKT3gammal (Ala-ala) (anticuerpo monoclonal anti-CD3), interferón-alfa oral, lactobacillus oral y LymphoStat-B™ se pueden usar junto con las sustancias terapéuticas de fusión de albúmina de la invención sujeto en trasplante de las células de los islotes o de páncreas.

#### **Ejemplo 17: Modelo de ratón *in vivo* de DMNID**

Los ratones C57BL/6J macho de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) se pueden obtener a las 3 semanas de edad y se les alimentó con pienso convencional o dietas enriquecidas con grasa (35,5 % peso/peso, Bioserv.Frenchtown, NJ) o fructosa (60 % peso/peso, Harlan Teklad, Madison, WI). El pienso regular está compuesto por 4,5 % peso/peso de grasa, 23 % peso/peso de proteína, 31,9 % peso/peso de almidón, 3,7 % peso/peso de fructosa y 5,3 % peso/peso de fibra. La dieta rica en grasa (manteca) está compuesta por 35,5 % peso/peso de grasa, 20 % peso/peso de proteína, 36,4 % peso/peso de almidón, 0,0 % peso/peso de fructosa y 0,1 % peso/peso de fibra. La dieta rica en fructosa está compuesta por 5 % peso/peso de grasa, 20 % peso/peso de proteína, 0,0 % peso/peso de almidón, 60 % peso/peso de fructosa y 9,4 % peso/peso de fibra. Los ratones se enjaularán a no más de cinco por jaula a una habitación con temperatura de 22° +/- 3° C y 50 % +/- 20 % de humedad controladas con un ciclo de 12 horas de luz (de 6 de la mañana a 6 de la noche) / oscuridad (Luo et al., 1998, Metabolism 47(6): 663 - 8. 663-8, "Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus": Larsen et al., Diabetes 50(11): 2530 - 9 (2001). "Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats"). Tras la exposición a las respectivas dietas durante 3 semanas, se puede inyectar a los ratones por vía intraperitoneal estreptozotocina "STZ" (Sigma, St. Louis, MO), a 100 mg/kg de peso corporal o vehículo (0,05 mol/l de ácido cítrico, pH 4,5) y se mantuvieron con la misma dieta durante las siguientes 4 semanas. En condiciones sin ayuno se obtiene sangre 1, 2 y 4 semanas después de la STZ extrayéndola en la parte distal de la cola. Las muestras se usan para medir a glucosa en plasma sin ayunar y las concentraciones de insulina. El peso corporal y la ingesta de alimentos se registran semanalmente.

Para determinar directamente el efecto de la dieta rica en grasas sobre la capacidad de la insulina para estimular la eliminación de la glucosa, los experimentos se pueden iniciar en tres grupos de ratones, alimentados con grasas, alimentados con pienso y a los que se inyectó vehículo y alimentados con grasa y a los que se inyectó STZ al final del periodo de 7 semanas descrito anteriormente. Los ratones se pueden dejar en ayunas durante 4 horas antes de los experimentos. En la primera serie de experimentos, se puede anestésiar a los ratones mediante inhalación de metoxiflurano (Pitman-Moor, Mundelein, IL). Se puede inyectar insulina regular (Sigma) por vía intravenosa ([IV] 0,1 U/kg de peso corporal) a través de la vena de la cola y se puede extraer sangre 3, 6, 9, 12 y 15 minutos después de la inyección de una vena de la cola diferente. Las concentraciones de glucosa en plasma se pueden determinar en estas muestras y se puede calcular la semivida ( $t_{1/2}$ ) de la desaparición de glucosa del plasma usando WinNonlin (Scientific Consulting, Apex, NC), un programa de software de farmacocinética/farmacodinamia.

En la segunda serie de experimentos, se puede anestésiar a los ratones con pentobarbital sódico intraperitoneal (Sigma). Se abre la cavidad abdominal y se expone la principal vena abdominal y se introduce un catéter i.v. de calibre 24 (Johnson-Johnson Medical, Arlington, TX). El catéter se fija al tejido muscular adyacente a la vena abdominal, se corta por el fondo de la conexión de la jeringa y se engancha a un tubo de plástico PE50 precargado, que a su vez está conectado a una jeringa con la solución de infusión. Después, se cierra la cavidad abdominal mediante suturas. Con este enfoque, no se produciría un bloqueo del retroflujo de la sangre desde la parte inferior del cuerpo. Se puede perfundir continuamente glucosa en los ratones (24,1 mg/kg/min) e insulina (10 mU/kg/min) a un volumen de infusión de 10  $\mu$ l/min. Se puede extraer muestras de sangre retroorbital (70  $\mu$ l cada una) a 90, 105, 120 y 135 minutos después del inicio de la infusión para medir las concentraciones de glucosa y de insulina en plasma. La media de estas cuatro muestras se usa para estimar las concentraciones en equilibrio de glucosa



(SSPG) y de insulina (SSPI) en plasma para cada animal.

Por último, se pueden realizar experimentos para evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de albúmina, las composiciones terapéuticas de la presente solicitud, solas o en combinación con uno cualquiera o más de los fármacos terapéuticos indicados para el tratamiento de la diabetes mellitus, para disminuir la glucosa en plasma, en los dos grupos siguientes de modelos de ratones "DMNID" en los que se ha inyectado STZ. (1) C57BL/6J alimentados con grasas y (2) C57BL/6J alimentados con fructosa. Las concentraciones de glucosa en plasma de los ratones para estos estudios pueden variar de 255 a 555 mg/dl. Los ratones se asignan al azar a recibir tratamiento con vehículo, sustancias terapéuticas de fusión de albúmina de la presente invención, solas o en combinación con uno cualquiera o más de los fármacos terapéuticos indicados para el tratamiento de la diabetes mellitus. Se puede administrar un total de tres dosis. Se pueden extraer muestras de sangre de la vena de la cola para medir la concentración de glucosa en plasma antes de la primera dosis y 3 horas después de la dosis final.

Las concentraciones de glucosa en plasma se pueden determinar usando el kit Glucose Diagnostic de Sigma (Sigma No. 315), un ensayo colorimétrico enzimático. Los niveles de insulina en plasma se pueden determinar usando el kit RIA para insulina en ratas de Linco Research (#RI-13K; St. Charles, MO).

#### 15 **Ejemplo 18: Ensayos indicadores H4IIE-SEAP *in vitro* que establecen la implicación en la acción de la insulina**

##### *Los diversos indicadores H4IIE*

H4IIE/rMEP-SEAP: El promotor de la enzima málica aislada de rata (rMEP) contiene un elemento de PPAR-gamma que está en la vía de la insulina. Esta construcción indicadora se transfecta de forma estable en la línea celular hepática H4IIE.

20 H4IIEc/SREBP-SEAP: La proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) es un factor de transcripción que actúa sobre los promotores de una serie de genes sensibles a la insulina, por ejemplo, la sintetasa de ácidos grasos (FAS) y que regula la expresión de genes clave en el metabolismo de los ácidos grasos en los fibroblastos, adipocitos y hepatocitos. SREBP-1c, también conocido como el factor 1 de determinación y diferenciación de adipocitos (ADD-1), se considera el principal mediador de los efectos de la insulina sobre la expresión génica en las células adiposas. Su actividad está modulada por los niveles de insulina, esteroides y glucosa. Esta construcción indicadora se transfecta de forma estable en la línea celular hepática H4IIE.

H4IIE/FAS-SEAP: Las construcciones indicadoras de la sintetasa de ácidos grasos contienen un promotor mínimo FAS respondedor a SREBP. Esta construcción indicadora se transfecta de forma estable en la línea celular hepática H4IIE.

30 H4IIE/PEPCK-SEAP: El promotor de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK) es el sitio primario de la regulación hormonal de la transcripción del gen PEPCK que modula la actividad de PEPCK. La PEPCK cataliza una etapa comprometida y limitante de la velocidad en la gluconeogénesis hepática y por lo tanto, debe controlarse cuidadosamente para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de los límites normales. Esta construcción indicadora se transfecta de forma estable en la línea celular hepática H4IIE.

35 Estas construcciones indicadoras también pueden transfectarse de forma estable en fibroblastos 3T3-L1 y mioblastos L6. Estas líneas celulares estables se diferenciaron después en los adipocitos 3T3-L1 y los miotubos L6 descritos anteriormente en el Ejemplo 41. Las líneas de células diferenciadas se pueden usar a continuación en el ensayo de SEAP se describe a continuación.

##### *Medio de crecimiento y de ensayo*

40 El medio de crecimiento comprende 10 % de suero bovino fetal (FBS), 10 % de suero de ternera, 1 % de NEAA, 1x de penicilina / estreptomina y 0,75 mg / ml de G418 (para H4IIE / RFA-SEAP y H4IIE / SREBP-SEAP) o 0,50 mg / ml de G418 (para H4IIE / rMEP-SEAP). Para H4IIE / PEPCK-SEAP, el medio de crecimiento se compone de 10 % de FBS, 1 % de penicilina / estreptomina, solución salina tamponada con HEPES 15 mM y 0,50 mg / ml de G418.

45 El medio de ensayo consiste en medio DMEM bajo en glucosa (Life Technologies), 1 % de NEAA, 1x de penicilina / estreptomina para la H4IIE / RFA-SEAP. Indicadores H4IIE/SREBP-SEAP, H4IIE/rMEP-SEAP. El medio de ensayo para el indicador H4IIE / PEPCK-SEAP consiste en 0,1 % de FBS, 1 % de penicilina / estreptomina y solución salina tamponada con HEPES 15 mM.

##### *Procedimiento*

50 Las placas de 96 pocillos se siembran a 75.000 células / pocillo en 100 µl / pocillo del medio de crecimiento hasta que las células en fase de crecimiento log se hacen adherentes. Las células se dejan sin alimento durante 48 horas, sustituyendo el medio de crecimiento por medio de ensayo 200 µl / pocillo. (Para las células H4IIE / PEPCK-SEAP, se añade medio de ensayo que contiene dexametasona 0,5 µM a 100 µl / pocillo y se incuban durante aproximadamente 20 horas). El medio de ensayo se sustituye después con 100 µl / pocillo de medio de ensayo fresco y al pocillo se añade un alícuota de 50 µl / del sobrenadante de las células obtenido a partir de líneas celulares

transfectadas que expresan los agentes terapéuticos de la presente invención (por ejemplo, proteínas de fusión de albúmina de la invención y fragmentos y variantes de la misma). Los sobrenadantes de las líneas celulares transfectadas con el vector vacío se usan como control negativo. La adición de insulina 10 nM y / o 100 nM a los pocillos se usa como control positivo. Después de 48 horas de incubación, los medios acondicionados se cosechan y la actividad SEAP se mide (protocolo Phospha-Light System, Tropix # BP2500). Brevemente, las muestras se diluyen a 1: 4 en tampón de dilución y se incuban a 65 ° C durante 30 minutos para inactivar la forma no placentaria endógena de SEAP. Un alícuota de 50 µl de las muestras diluidas se mezcla con 50 µl de tampón de ensayo SEAP que contiene una mezcla de inhibidores activos contra las isoenzimas SEAP no placentarias y se incuba durante otros 5 minutos. Un alícuota de 50 µl de sustrato quimioluminiscente CSPD que se diluye a 1:20 en potenciador de luminiscencia Emerald se añade a la mezcla y se incuba durante 15-20 minutos. Las placas se leyeron en un luminómetro Dynex de placas.

#### **Ejemplo 19: preparación de proteínas de fusión HA-citocina o HA-factor de crecimiento (GCSF).**

El ADNc para la citocina o el factor de crecimiento de interés, tal como EPO, puede aislarse por una diversidad de medios incluyendo a partir de bibliotecas de ADN, por RT-PCR y por PCR usando una serie de cebadores oligonucleotídicos sintéticos solapantes, usando todos procedimientos estándar. Las secuencias nucleotídicas para todas estas proteínas se conocen y están disponibles, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. 4.810.643. El ADNc puede ser tailored en los extremos 5' y 3' para generar sitios de restricción, de tal forma que se pueden usar engarces oligonucleotídicos, para clonar el ADNc en un vector que contiene el ADNc para HA. Esto puede estar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal con o sin el uso de una secuencia espaciadora. El ADNc de G-CSF se clona en un vector tal como pPPC0005 (Figura 2), pScCHSA, pScNHSA, o pC4:HSA a partir del que la casete de expresión completa se escinde después y se inserta después en el plásmido pSAC35 para permitir la expresión de la proteína de fusión de albúmina en levadura. La proteína de fusión de albúmina secretada a partir de la levadura puede recogerse y purificarse después a partir de los medios y someterse a prueba sobre su actividad biológica. Para expresión en líneas celulares de mamíferos, se adopta un procedimiento similar excepto en que el casete de expresión usado emplea un promotor de mamífero, una secuencia líder y un terminador (véase ejemplo 1). Este casete de expresión se escinde después y se inserta después en un plásmido adecuado para la transfección de líneas celulares de mamíferos.

#### **Ejemplo 20: expresión bacteriana de una proteína de fusión de albúmina.**

Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención que comprende una secuencia señal bacteriana se amplifica usando cebadores oligonucleotídicos de PCR que corresponden a los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, para sintetizar fragmentos de inserción. Los cebadores usados para amplificar el inserto codificante polinucleotídico deben contener preferentemente sitios de restricción, tales como BamHI y XbaI, en el extremo 5' de los cebadores con el fin de clonar el producto amplificado en el vector de expresión. Por ejemplo, BamHI y XbaI corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión bacteriano pQE-9. (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA), este vector plasmídico codifica resistencia a antibiótico (Amp<sup>r</sup>), un origen bacteriano de replicación (ori), un promotor/operador regulable por IPTG (P/O), un sitio de unión de ribosomas (RBS), una marca de 6 histidinas (6-His) y sitios de clonación de enzimas de restricción.

El vector de pQE-9 se digiere con BamHI y XbaI y el fragmento amplificado se liga en el vector pQE-9 manteniendo la fase de lectura iniciada en el RBS bacteriano. La mezcla de ligación se usa después para transformar la cepa de *E. coli* M15/rep4 (Qiagen, Inc.) que contiene copias múltiples del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y que confiere también resistencia a kanamicina (Kan<sup>r</sup>). Los transformantes se identifican por su capacidad para cultivo en placas de LB y se seleccionan colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. El ADN plasmídico se aísla y se confirma por análisis de restricción.

Los clones que contienen las construcciones deseadas se cultivan durante toda una noche (O/N) en cultivo líquido en medio LB suplementado tanto con Amp (100 µg/ml) como con Kan (25 µg/ml). El cultivo O/N se usa para inocular un cultivo grande en una proporción de 1:100 hasta 1:250. Las células se cultivan hasta una densidad óptica de 600 (D.O.<sup>600</sup>) de entre 0,4 y 0,6. Se añade después IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM. IPTG induce inactivando el represor lacI, aclarando el P/O conduciendo a expresión génica incrementada.

Las células se cultivaron durante un extra de 3 a 4 horas. Las células se recogieron después por centrifugación (20 minutos a 6000 x g). El sedimento celular se solubilizó en el agente caotrópico guanidina HCl 6 molar o preferentemente en urea 8 M y concentraciones mayores que 2-mercaptoetanol 0,14 M agitando durante 3-4 horas a 4 °C (véase, por ejemplo, Burton et al., *Eur. J. Biochem.* 179:379-387 (1989)). El desecho celular se retira por centrifugación y el sobrenadante que contiene el polipéptido se carga sobre una columna de resina de afinidad de ácido níquel-nitrilo-tri-acético ("Ni-NTA") (disponible de QIAGEN, Inc., *supra*). Las proteínas con una marca de 6 x His se unen a la resina Ni-NTA con afinidad alta y se pueden purificar en un procedimiento de una etapa simple (para detalles véase el documento: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., *supra*).

Brevemente, el sobrenadante se carga sobre la columna en guanidino-HCl 6 M, pH 8. La columna se lava primero con 10 volúmenes de guanidino-HCl 6 M, pH 8, después se lava con 10 volúmenes de guanidino-HCl 6 M pH 6 y finalmente el polipéptido se eluye con guanidino-HCl 6 m, pH 5.

La proteína purificada se renaturaliza después dializándola frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón Na-acetato 50 mM, pH 6 más NaCl 200 mM. Alternativamente, puede replegarse exitosamente mientras se inmoviliza en la columna Ni-NTA. Las condiciones ejemplares son como sigue: renaturalizar usando un gradiente de urea 6M-1M lineal en NaCl 500 mM, glicerol al 20 %, Tris 20 mM/HCl pH 7,4, conteniendo inhibidores de proteasa.

5 La renaturalización debe llevarse a cabo durante un periodo de 1,5 horas o más. Después de la renaturalización, las proteínas se eluyen por la adición de imidazol 250 mM. Inidazol se retira por una etapa de dialización final frente a PBS o frente a tampón de acetato de sodio 50 mM pH 6 más NaCl 200 mM. La proteína purificada se almacena a 4 °C o se congela a -80 °C.

Además del vector de expresión anterior, también se divulga un vector de expresión, llamado pHE4a (número de acceso ATCC 209645, depositado el 25 de febrero, 1998) que contiene operador de fago y elementos promotores unidos operativamente a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, llamada pHE4a. (Número de acceso ATCC 209645, depositado el 25 de febrero, 1998). Este vector contiene: 1) un gen de neomicinofosfotransferasa como un marcador de selección, 2) un origen de replicación de *E. coli*, 3) una secuencia promotora de fago T5, 4) dos secuencias operadoras de lac, 5) una secuencia de Shine-Delgamo y 6) el gen represor de operón de lactosa (lacIq). El origen de replicación (oriC) se deriva de pUC19 (LTI, Gaithersburg, MD). Las secuencias promotora y operadora se fabrican sintéticamente.

10

15

El ADN se puede insertar en el pHE4a restringiendo el vector con NdeI y XbaI, BamHI, XhoI, o Asp718, corriendo el producto restringido en un gel y aislando el fragmento mayor (el fragmento de relleno debe ser de aproximadamente 310 pares de bases). El inserto de ADN se genera de acuerdo con protocolos de PCR descritos en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica, usando cebadores de PCR que tienen sitios de restricción para NdeI (cebador 5') y XbaI, BamHI, XhoI, o Asp718 (cebador 3'). El inserto de PCR se purifica en gel y se somete a restricción con enzimas compatibles. El inserto y el vector están ligados de acuerdo con protocolos estándar.

20

El vector manipulado se puede sustituir en el protocolo anterior para expresar proteína en un sistema bacteriano.

#### **Ejemplo 21: Expresión de una proteína de fusión de albúmina en células de mamífero**

Las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención se pueden expresar en una célula de mamífero. Un vector de expresión en mamíferos típico contiene un elemento promotor que media en la iniciación de la transcripción de ARNm, una secuencia de codificación proteica y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para corte y empalme del ARN. Se consigue una transcripción muy eficaz con los promotores tardío y temprano de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo RSV, HTLVI, HIVI y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). No obstante, también se pueden usar elementos celulares (p. ej., el promotor de la actina humana).

25

30

Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0 y pCMVSPORT 3.0. Entre las células huésped de mamífero que se pueden usar se incluyen Hela humanas, 293, H9 y células Jurkat, NIH3T3 de ratón y células C127, células Cos 1, Cos 7 y CV1, células quail QC1-3, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

35

Como alternativa, la proteína de fusión de albúmina se puede expresar en líneas celulares estables que contienen el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de albúmina integrada en un cromosoma. La cotransfección con un marcador seleccionable, tal como DHFR, gpt, neomicina, higromicina, permite la identificación y el aislamiento de las células transfeccionadas.

40

El polinucleótido transfectado que codifica la proteína de fusión también se puede amplificar para expresar cantidades grandes de la proteína de fusión codificada. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos, o incluso varios miles, de copias del gen de interés. (Véase, por ejemplo, Alt et al., *J. Biol. Chem.* 253:13571370 (1978); Hamlin et al., *Biochem. et Biophys. Acta*, 1097:107143 (1990); Page et al., *Biotechnology* 9: 64 - 68 (1991)). Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) Murphy et al., *Biochem J.* 227:277279 (1991); Bebbington et al., *Bio/Technology* 10, 169 -175 (1992). Usando estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el o los genes amplificados integrados en un cromosoma. Se suelen usar células de ovario de hámster chino (CHO) y células NSO para la producción de proteínas.

45

50

Los derivados del plásmido pSV2-dhfr (nº de acceso en la ATCC 37146), los vectores de expresión pC4 (nº de acceso en ATCC 209646) y pC6 (nº de acceso en ATCC 209647) contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen et al., *Molecular and Cellular Biology*, 438 - 447 (March, 1995)) plus a fragment of the CMV-enhancer (Boshart et al., *Cell* 41:521530 (1985)). Los sitios de clonación múltiples, por ejemplo con oos sitios de escisión con enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores también contienen el intrón en 3', la señal de poliadenilación y de terminación del gen de la preproinsulina de rata y el gen dela DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano del SV40.

55

Específicamente, el plásmido pC6, por ejemplo, se digiere con enzimas de restricción adecuadas y después se

desfosforila usando fosfatos intestinales bovinos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Después se aísla el vector desde un gel de agarosa al 1 %.

Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención se genera usando técnicas conocidas en la técnica y este polinucleótido se amplifica usando tecnología de PCR conocida en la técnica. Si se usa una secuencia señal natural para producir la proteína de fusión de la presente invención, el vector no necesita un segundo péptido señal. Como alternativa, si no se usa una secuencia señal natural, el vector se puede modificar para incluir una secuencia señal heteróloga. (Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 96/34891.)

El fragmento amplificado que codifica la proteína de fusión de la invención se aísla de un gel de agarosa al 1 % usando un kit disponible comercialmente ("GeneClean," BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento se digiere después con las enzimas de restricción adecuadas y de nuevo se purifican en un gel de agarosa al 1 %.

El fragmento amplificado que codifica la proteína de fusión de albúmina de la invención se digiere después con las mismas enzimas de restricción y se purifican en un gel de agarosa al 1 %. El fragmento aislado y el vector desfosforilado se ligan después con ADN ligasa de T4. Después, las células *E. coli* HB101 o XL-1 Blue se transforman y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC6 usando, por ejemplo, análisis con enzimas de restricción.

Para la transfección se usan células de ovario de hámster chino que carecen de un gen de la DHFR activo. Cinco µg del plásmido de expresión pC6 o pC4 se cotransfecta con 0,5 µg del plásmido pSVneo usando lipofectina (Felgner et al., *supra*). El plásmido pSVneo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen *neo* de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos, incluyendo G418. Las células se siembran en medio MEM menos alfa suplementado con 1 mg/ml de G418. Tras 2 días, las células se digieren con tripsina y se siembran en placas de clonación con hibridoma (Greiner, Alemania) en medio MEM menos alfa suplementado con 10, 25, or 50 ag/ml de metotrexato más 1 mg/ml de G418. Tras aproximadamente 10<sup>14</sup> días, los clones se digieren con tripsina y después se siembran en placas petri de 6 pocillos o matraces de 10 ml usando concentraciones diferentes de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). A continuación, los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato se transfieren a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones todavía mayores de metotrexato (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento de repite hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100 - 200 µM. La expresión de la proteína de fusión deseada se analiza mediante, por ejemplo, SDS-PAGE y transferencia Western o mediane análisis de HPLC de fase inversa.

#### **Ejemplo 22: Fusiones multifusión.**

Las proteínas de fusión de albúmina (por ejemplo, que contiene una proteína terapéutica fusionada a la albúmina pueden además estar fusionados con otras proteínas para generar "proteínas multifusión". Estas proteínas multifusión se pueden usar para varias aplicaciones. Por ejemplo, la fusión de las proteínas de fusión de albúmina de la invención es His-tag, HA-tag, proteína A, dominios de IgG y la proteína de unión a maltosa facilita la purificación. Véase, por ejemplo, el documento EP A 394,827; Traunecker et al., *Nature* 331:84 - 86 (1988)). La señal de localización nuclear fusionada con los polipéptidos de la presente invención puede dirigir la proteína a una localización subcelular específica, mientras que el heterodímero u homodímeros covalentes pueden aumentar o disminuir la actividad de una proteína de fusión de la albúmina. Adicionalmente, la fusión de secuencias de proteínas adicionales a las proteínas de fusión de albúmina de la invención puede aumentar aún más la solubilidad y / o estabilidad de la proteína de fusión. Las proteínas de fusión descritas anteriormente se pueden hacer usando o modificando de forma rutinaria técnicas conocidas en la técnica y / o modificando el siguiente protocolo, que resume la fusión de un polipéptido a una molécula de IgG.

Brevemente, la porción Fc humana de la molécula de IgG puede amplificarse por PCR, usando cebadores que abarcan los extremos 5' y 3' de la secuencia descrita más adelante. Estos cebadores también deberían tener sitios de enzimas de restricción convenientes que facilitarían la clonación en un vector de expresión, preferiblemente un vector de expresión de mamífero o de levadura.

Por ejemplo, si se usa pC4 (número de acceso en la ATCC 209646), la parte Fc humana puede ligarse en el sitio de clonación BamHI. Obsérvese que el sitio BamHI 3' debe destruirse. A continuación, el vector que contiene la porción Fc humana se vuelve a digerir con la enzima de restricción BamHI, se linealiza el vector y un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de albúmina de la presente invención (generado y aislarse usando técnicas conocidas en la técnica) se liga en este sitio BamHI. Tenga en cuenta que el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención se clona sin un codón de terminación, de lo contrario no se producirá una proteína de fusión que contenga Fc.

Si la secuencia señal natural se usa para producir la proteína de fusión de albúmina de la presente invención, pC4 no necesita un segundo péptido señal. Como alternativa, si no se usa una secuencia señal natural, el vector se puede modificar para incluir una secuencia señal heteróloga. (Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 96/34891.)

**Región Fc de IgG humana:**

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG  
CACCTGAATTCGAGGGTGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGA  
CACCTCATGATCTCCCGGACTCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGC  
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT  
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC  
AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC

AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG  
CTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGC  
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC  
CACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACC  
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT  
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAT  
GAGTGGCAGCGCCGCGACTCTAGAGGAT (SEC ID N° 1112)

**Ejemplo 23: Procedimiento de tratamiento usando terapia Génica ex vivo**

5 Un procedimiento de terapia génica trasplanta fibroblastos, que son capaces de expresar una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, a un paciente. Generalmente, los fibroblastos se obtienen de un sujeto mediante biopsia de piel. El tejido resultante se coloca en un medio de cultivo de tejidos y se separa en pequeños trozos. Pequeños trozos del tejido se colocan sobre una superficie húmeda de un matraz de cultivo de tejidos, aproximadamente diez piezas se colocan en cada matraz. El matraz se pone boca abajo, se cierra herméticamente y se deja a temperatura ambiente durante la noche. Después de 24 horas a temperatura ambiente, el matraz se invierte y los trozos de tejido permanecen fijados al fondo del matraz y se añade medio fresco (por ejemplo, medio F12 de Ham, con 10 % de FBS, penicilina y estreptomycin). A continuación se incuban los matraces a 37 grados C durante aproximadamente una semana.

10 En este momento, se añade medio fresco y posteriormente se cambia cada varios días. Después de dos semanas adicionales en cultivo, se produce una monocapa de fibroblastos. La monocapa se digiere con tripsina y se sella en matraces más grandes.

pMV-7 (. Kirschmeier, PT et al, DNA, 7: 219-25 (1988)), flanqueado por las repeticiones terminales largas del virus del sarcoma murino de Moloney, se digiere con EcoRI y HindIII y posteriormente se trata con fosfatasa intestinal de ternero. El vector lineal se fracciona en gel de agarosa y se purifica, usando perlas de vidrio.

20 Los polinucleótidos que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención pueden generarse usando técnicas conocidas en la técnica amplificado usando cebadores de PCR que corresponden a las secuencias en los extremos 5' y 3' y opcionalmente, con sitios de restricción apropiados y codones de iniciación / terminación en caso necesario. Preferiblemente, el cebador 5 'contiene un sitio EcoRI y el cebador 3' incluye un sitio HindIII. Se añaden cantidades iguales de la estructura lineal del virus del sarcoma murino de Moloney y el fragmento EcoRI y HindIII amplificado, en presencia de ADN ligasa de T4. mezcla resultante se mantiene en condiciones apropiadas para la ligación de los dos fragmentos. La mezcla de ligación se usa después para transformar bacterias HB101, que después se siembran en agar que contiene kanamicina con el propósito de confirmar que el vector tiene el gen de la propiedad de interés insertado.

30 Las células con pA317 anfotrópico o GP + am12 se cultivan en cultivo tisular hasta una densidad confluyente en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 10 % de suero de ternero (CS), penicilina y estreptomycin. El vector MSV que contiene el gen se añade luego a los medios y las células de empaquetamiento transducidas con el vector. Las células concentradas producen ahora partículas virales infecciosas que contienen el gen (las células concentradas se denominan ahora células productoras)

- Se añade más medio a las células productoras transducidas y posteriormente, los medios se cosechan de una placa de 10 cm de células productoras confluentes. Los medios gastados, que contienen las partículas virales infecciosas, se filtran a través de un filtro Millipore para eliminar las células productoras desprendidas y este medio se usa luego para infectar células de fibroblastos. Se retira el medio de una placa subconfluente de fibroblastos y se sustituye rápidamente con el medio de las células productoras. Este medio se elimina y se reemplaza con medio fresco. Si el título de virus es alto, entonces prácticamente todos los fibroblastos estarán infectados y no se requiere selección. Si el título es muy bajo, entonces es necesario usar un vector retroviral que tenga un marcador seleccionable, tal como neo o his. Una vez que los fibroblastos se han infectado de manera eficiente, los fibroblastos se analizan para determinar si se produce la proteína de fusión de albúmina.
- Los fibroblastos modificados se transplantan después al huésped, ya sea solos o después de haber sido cultivados hasta confluencia sobre perlas microportadoras Cytodex 3.

#### **Ejemplo 24: Procedimiento de tratamiento usando terapia Génica *in vivo***

- Otro aspecto de la presente invención es el uso de polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención en procedimientos de terapia génica *in vivo* para el tratamiento de trastornos, enfermedades y afecciones. El procedimiento de terapia génica se refiere a la introducción de secuencias de ácido nucleico desnudo (ADN, ARN y ADN o ARN antisentido) que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención en un animal. Los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención pueden estar unidos operativamente (es decir asociados) a un promotor o cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido por el tejido diana. Dichas técnicas y procedimientos de liberación y terapia génica se conocen en la técnica véase, por ejemplo, WO90/11092, WO98/11779; la patente de EE.UU. N° 5693622, 5705151, 5580859; Tabata et al., *Cardiovasc.Res.*35 (3): 470-479 (1997), Chao et al., *Pharmacol.Res.*35 (6): 517-522 (1997); Wolff, *Neuromuscul.Disord.*7 (5): 314-318 (1997); Schwartz et al., *Gene Ther.*3 (5): 405-411 (1996); Tsurumi et al., *Circulation* 94 (12): 3281 a 3290 (1996) 3(5):405 - 411 (1996); Tsurumi et al., *Circulation* 94(12):3281 - 3290 (1996).

- Las construcciones de polinucleótidos pueden administrarse por cualquier procedimiento que proporciona materiales inyectables a las células de un animal, tales como, inyección en el espacio intersticial de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, intestino y similares). Las construcciones de polinucleótidos pueden liberarse en un vehículo líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

- El término polinucleótido, ADN o ARN "desnudo" se refiere a secuencias que están libres de cualquier vehículo de liberación que actúa para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, de partículas vitales, formaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares. Sin embargo, los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la presente invención también pueden administrarse en formulaciones de liposomas (tales como las que se enseñan en Felgner PL et al (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772:126 - 139 y Abdallah B. et al. (1995) *Biol. Cell* 85(1):1 - 7) que se pueden preparar por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

- Las construcciones del vector polinucleotídico usados en el procedimiento de terapia génica son preferiblemente construcciones que no se integran en el genoma del huésped ni contienen secuencias que permiten la replicación. Cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la técnica se puede usar para dirigir la expresión del ADN. A diferencia de otras técnicas de terapia génica, una ventaja principal de la introducción de secuencias de ácidos nucleicos desnudos en las células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. Los estudios han demostrado que las secuencias de ADN no replicantes pueden introducirse en las células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante períodos de hasta seis meses.

- La construcción polinucleotídica puede liberarse en el espacio intersticial de los tejidos dentro de un animal, incluyendo el músculo, piel, cerebro, hígado pulmón, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula y tejido conjuntivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende el fluido intercelular, matriz de mucopolisacárido entre las fibras reticulares de los tejidos de órganos, fibras elásticas en las paredes de los vasos o cámaras, fibras de colágeno de tejidos fibrosos o esa misma matriz dentro del tejido conjuntivo de las células musculares o en las lagunas de hueso. Es igualmente el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el fluido linfático de los canales linfáticos. Se prefiere la liberación en el espacio intersticial del tejido muscular por las razones que se indican más adelante. Pueden administrarse convenientemente por inyección en los tejidos que comprenden estas células. Preferentemente se liberan y expresan en células persistentes que no se dividen, que se diferencian, aunque la administración y expresión pueden conseguirse en células no diferenciadas o diferenciadas menos completamente, tales como, por ejemplo, las células madre de la sangre o los fibroblastos de la piel. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad de captar y expresar polinucleótidos.

- Para la inyección polinucleotídica desnuda, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 g / kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg / kg de peso corporal. Preferentemente, la dosis será de aproximadamente 0,005 mg / kg a aproximadamente 20 mg / kg y más preferentemente de aproximadamente 0,05 mg / kg a aproximadamente 5 mg / kg. Por supuesto, como el experto en la técnica apreciará, esta dosis variará según el sitio del tejido de la inyección. La dosificación apropiada y eficaz de

la secuencia de ácido nucleico pueden determinarla fácilmente los expertos normales en la técnica y puede depender de la afección que se va a tratar y de la vía de administración. La vía de administración preferida es mediante inyección parenteral en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también pueden usarse otras vías parenterales tales como inhalación de una formulación en aerosol especialmente para la liberación en los pulmones o tejidos bronquiales, garganta o membranas mucosas de la nariz. Además, las construcciones de polinucleótidos desnudos pueden liberarse en las arterias durante la angioplastia mediante catéter usado en el procedimiento.

Los efectos de dosis-respuesta del polinucleótido inyectado en el músculo *in vivo* se determina como sigue. El ADN molde adecuado para la producción de ARNm que codifica para el polipéptido de la presente invención se prepara de acuerdo con una metodología de ADN recombinante estándar. El ADN molde, que puede ser circular o lineal, se usa como ADN desnudo o completado con liposomas. Los músculos del cuádriceps de los ratones se inyectan con diversas cantidades del molde de ADN.

Ratones Balb / C hembra y macho de 5 a 6 semanas de edad se anestesian por inyección intraperitoneal con 0,3 ml de Avertin 2,5 %. Se realiza una incisión de 1,5 cm en el muslo anterior y el músculo cuádriceps se visualiza directamente. El ADN molde se inyecta en 0,1 ml de portador en una jeringa de 1 cc a través de una aguja de calibre 27 durante un minuto, aproximadamente a 0,5 cm del sitio de inserción distal del músculo dentro de la rodilla y alrededor de 0,2 cm de profundidad. Una sutura se coloca sobre el sitio de la inyección para la futura localización y la piel se cierra con pinzas de acero inoxidable.

Después de un tiempo de incubación adecuado (por ejemplo, 7 días), los extractos musculares se preparan mediante la escisión de la totalidad de los cuádriceps. Cada quinta sección transversal de los músculos cuádriceps individuales de 15  $\mu$ m se tiñe histoquímicamente para determinar la expresión de proteínas. Un curso de tiempo para la expresión de proteínas de fusión puede llevarse a cabo de una manera similar, excepto porque cuádriceps de diferentes ratones se cosechan en diferentes momentos. La persistencia de ADN en el músculo después de la infección se puede determinar por análisis de transferencia de tipo Southern después de la preparación de ADN celular y sobrenadantes HIRT totales procedentes de ratones inyectados y control. Los resultados de la experimentación anterior en los ratones pueden usarse para extrapolar dosis adecuadas y otros parámetros de tratamiento en seres humanos y otros animales usando ADN desnudo.

#### **Ejemplo 25: Animales transgénicos.**

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden expresarse en animales transgénicos. Los animales de cualquier especie, incluyendo, entre otros, ratones, ratas, conejos, hámsters, cobayas, cerdos, microcerdos, cabras, ovejas, vacas y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés pueden ser usado para generar animales transgénicos. En una realización específica, las técnicas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica, se usan para expresar proteínas de fusión de la invención en los seres humanos, como parte de un protocolo de terapia génica.

Cualquier técnica conocida en la técnica se puede usar para introducir los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención en animales para producir las líneas fundadoras de animales transgénicos. Tales técnicas incluyen, entre otras, microinyección pronuclear (Paterson et al., Appl.Microbiol.Biotechnol.40: 691-698 (1994); . Carver et al, Biotechnology (NY) 11: 1263-1270 (1993); . Wright et al, Biotechnology (NY) 9: 830-834 (1991); y Hoppe et al., U.S. Pat. No. 4,873,191 (1989)); retrovirus mediada por la transferencia de genes en líneas germinales (Van der Putten et al., Proc.Natl.Acad.Sci., EE.UU. 82: desde 6148 hasta 6152 (1985)), Blastocistos o embriones; la orientación de genes en células madre embrionarias (Thompson y otros, Cell 56: 313-321 (1989)); electroporación de células o embriones (Lo, 1993, Mol Cell.Biol.3: 1803-1814 (1983)); introducción de los polinucleótidos de la invención usando una pistola génica (véase, por ejemplo, . Ulmer et al, Science 259: 1745 (1993); la introducción de construcciones de ácido nucleico en células madre pluripotenciales embrionarias y la transferencia de las células madre de nuevo en el blastocisto; y transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano y otros, Cell 51: 717-123 (1989); etcPara una revisión de tales técnicas, véase Gordon, "Animales Transgénicos". InternacionalRev.Cytol.115: 171-229 (1989).

Cualquier técnica conocida en la técnica puede usarse para producir clones transgénicos que contienen polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de la albúmina de la invención, por ejemplo, transferencia nuclear en oocitos enucleados de los núcleos enbrión fetal cultivado o células adultas inducidas a la quiescencia (Campell et al, Nature 380: 64-66 (1996); Wilmut et al., Nature 385-810-813 (1997))

Se desvelan en la presente memoria animales transgénicos que llevan los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de la albúmina de la invención en todas sus células, así como animales que llevan estos polinucleótidos en algunas, pero no todas sus células, es *decir*, animales mosaico o quiméricos. Los transgénicos pueden estar integrados con un único transgén o como múltiples copias, como en concatámeros, *por ejemplo*, Tándems de cabeza a cabeza o tándems de cola a cabeza. El transgén también se puede introducir selectivamente en y activado en un tipo celular particular siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Lasko et al. (Lasko et al., Proc.Natl. Acad.Sci. USA. 89: 6232 a 6236 (1992)). Las secuencias reguladoras requeridas para la activación específica, un tipo de célula dependerán del tipo de célula particular de Interseal y serán evidentes para los expertos

en la técnica. Cuando se desea que el polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención puede integrar en el sitio cromosómico del gen endógeno correspondiente a la porción de proteína terapéutica o la porción abumin de la proteína de fusión de la invención, se prefiere la orientación de genes. Brevemente, cuando se va a usar una técnica tales, vectores que contienen algunas secuencias de nucleótidos homólogas al gen endógeno están diseñadas para el fin de integrar, a través de recombinación homóloga con secuencias cromosómicas, en e interrumpiendo la función de la secuencia de nucleótidos del gen endógeno. El transgén también se puede introducir selectivamente en un tipo celular particular, inactivando de este modo el gen endógeno en solo ese tipo de célula, siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Gu et al. (Gu et al, Science 265: 103-106. (1994)). Las secuencias reguladoras requeridas para dicha inactivación específica de un tipo de célula dependerán del tipo de célula particular de interés y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Una vez que los animales transgénicos se han generado, la expresión del gen recombinante puede ensayarse usando técnicas estándar. La selección inicial se puede lograr mediante técnicas de análisis de Southern blot o PCR para analizar tejidos animales para verificar que la integración del polinucleótido que codifica el protien fsuion de la invención ha tenido lugar. El nivel de expresión del ARNm del polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención en los tejidos de los animales transgénicos también puede evaluarse usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, in situ análisis de hibridación y la transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR). Las muestras de tejido de fusión que expresa la proteína también se puede evaluar inmunocytochemically o inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos para la proteína de fusión.

Una vez que se producen los animales fundadores, pueden ser criados, innato, outbred, o mestizo para producir colonias del animal particular. Ejemplos de tales estrategias de reproducción incluyen, pero no se limitan a: exogamia de animales fundadores con más de un sitio de integración para establecer líneas separadas; endogamia de líneas separadas con el fin de producir transgénicos compuestos que expresan el transgén a niveles más altos debido a los efectos de aditivo expresión de cada transgén; cruce de animales transgénicos heterocigotos para producir animales homocigotos para un sitio de integración dado con el fin de aumentar tanto la expresión y eliminar la necesidad para la detección de los animales mediante análisis de ADN; cruce de líneas homocigóticas separadas para producir heterozygous compuesto o líneas homocigóticas; y cría para colocar el transgén (es decir, polinucleótido que codifica una proteína de fusión de la albúmina de la invención) en un fondo distinto que es apropiado para un modelo experimental de interés..

Los animales transgénicos tienen usos que incluyen, entre otros, sistemas de modelos animales útiles en la elaboración de la función biológica de las proteínas de fusión de la invención y la proteína terapéutica y / o componente de la albúmina de la proteína de fusión de la invención, las condiciones que estudian y / o trastornos asociados con la expresión aberrante y en el cribado de compuestos eficaces en la mejora de tales condiciones y / o trastornos.

**Ejemplo 26: Ensayos de Detección de estimulación o inhibición de la proliferación y diferenciación de linfocitos B**

La generación de respuestas inmunitarias humorales funcionales requiere tanto la señalización soluble y cognado entre las células de linaje B y sus señales microambiente puede impartir un estímulo positivo que permite que una célula de linaje B para continuar su desarrollo programado, o de un estímulo negativo que indica a la célula a detener su vía de desarrollo actual. Hasta la fecha, se han encontrado numerosas señales estimuladoras e inhibitoras de influir en la capacidad de respuesta de células B incluyendo IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-14 e IL-15 . Curiosamente, estas señales son por sí mismos efectores débiles, pero pueden, en combinación con diversas proteínas coestimuladoras, inducir la activación, proliferación, diferenciación, retorno, tolerancia y muerte entre las poblaciones de células B.

Una de las clases mejor estudiados de proteínas coestimuladoras de células B es la superfamilia de TNF-. Dentro de esta familia CD40, CD27 y CD30 junto con sus respectivos ligandos de CD154, CD70, CD153 y se ha encontrado que regulan varias respuestas inmunes. Los ensayos que permiten la detección y / o observación de la proliferación y diferenciación de estas poblaciones de células B y sus precursores son herramientas valiosas en la determinación de los efectos diversas proteínas pueden tener en estas poblaciones de células B en términos de proliferación y diferenciación. A continuación se enumeran dos ensayos diseñados para permitir la detección de la diferenciación, la proliferación o inhibición de poblaciones de células B y sus precursores.

Ensayo *in vitro*, las proteínas de fusión de albúmina de la invención (incluyendo proteínas de fusión que contienen fragmentos o variantes de proteínas terapéuticas y / o albúmina o fragmentos o variantes de la albúmina) se pueden evaluar por su capacidad para inducir activación, proliferación, diferenciación o inhibición y / o muerte en poblaciones de células B y sus precursores. La actividad de una proteína de fusión de albúmina de la invención o células B humanas purificadas de las amígdalas, medida cualitativamente con el intervalo de dosis de 0,1 a 10.000 ng / ml, se evalúa en un ensayo de coestimulación linfocitos B estándar en el que las células B de las amígdalas se cultivan en presencia de formalina *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) fijado en formalina o anticuerpo IgM anti-humano inmovilizado como agente de cebado. Las segundas señales, tales como IL-2 e IL-15 sinergizan con SAC y reticulan con IgM para provocar la proliferación de células B medida mediante la incorporación de timidina tritiada.



Los nuevos agentes de sinergia pueden identificarse fácilmente usando este ensayo. El ensayo consiste en aislar las células B humanas de las amígdalas mediante depleción en perlas magnéticas (MACS) de las células CD3-positivas. La población celular resultante es mayor que 95 % de células B según se evalúa mediante la expresión de CD45R (B220).

- 5 Varias diluciones de cada muestra se colocan en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos a los que se añaden  $10^5$  células B en suspensión en medio de cultivo (RPMI 1640 que contiene 10 % de FBS,  $5 \times 10^{-5}$  M 2ME, 100 U / ml de penicilina, 10 ug / ml de estreptomycin y  $10^{-5}$  dilución de SAC) en un volumen total de 150ul. Proliferación o inhibición se cuantifica mediante un impulso 20h (1uCi / pocillo) con 3H-timidina (6,7 Ci / mM) a partir de 72 h después. Los controles positivos y negativos son IL2 y medio respectivamente.
- 10 *Ensayo in vivo*- En ratones BALB / c se inyecta (ip) dos veces al día solo tampón, o 2 mg / kg de una proteína de fusión de la albúmina de la invención (incluyendo proteínas de fusión que contienen fragmentos o variantes de proteínas terapéuticas y / o albúmina o fragmentos o variantes de albúmina). Los ratones reciben este tratamiento durante 4 días consecutivos, tras lo cual se sacrifican y se extraen diversos tejidos y suero para su análisis. La comparación de secciones teñidas con H & E de bazo normales y bazos tratados con la proteína de fusión de albúmina de la invención identifica los resultados de la actividad de la proteína de fusión en células de bazo, tales como la difusión de la vainas linfáticas periarteriales y / o aumentos significativos en la celularidad nucleada de las regiones pulpa roja, lo que puede indicar la activación de la diferenciación y proliferación de poblaciones de células B. Los estudios de inmunohistoquímica usando un fabricante de células B, anti-CD45R (B220), se usan para determinar si los cambios fisiológicos en las células del bazo, como la desorganización del bazo, se deben al aumento de la representación de las células B dentro de las zonas de células B vagamente definidas que se infiltran establecidos regiones de células T.

El análisis por citometría de flujo de los bazos de ratones tratados con la proteína de fusión de albúmina se usa para indicar si la proteína de fusión de albúmina aumenta específicamente la proporción de ThB +, CD45R (B220) células B apagados más de lo que se observa en los ratones control.

- 25 Asimismo, una consecuencia predicha del aumento de la representación de células B maduras in vivo es un aumento relativo en los títulos de Ig en suero. Por consiguiente, los niveles de IgM e IgA de suero se compararon entre los ratones tratados con la proteína tampón y de fusión.

#### **Ejemplo 27: Ensayo de proliferación de linfocitos T.**

- 30 Un ensayo de proliferación inducida por CD3 se realiza en PBMC y se mide por la captación de  $^3$ H-timidina. El ensayo se realiza como se describe a continuación. Las placas de noventa y seis pocillos se recubren con 100  $\mu$ l / pocillo del mAb frente CD3 (HIT3a, Pharmingen) o con el mAb de control de isotipo coincidente (B33.1) durante la noche a 4 grados C (1 mg / ml en tampón de bicarbonato 0,05M, pH 9,5 ), después se lavan tres veces con PBS. Los PBMC se aíslan mediante centrifugación en gradiente F / H a partir de sangre periférica humana y se añaden a los pocillos por cuadruplicado ( $5 \times 10^4$  placas / pocillo) de placas recubiertas con mAb en RPMI que contenía FCS al 10 % y P / S en presencia de concentraciones variables de una proteína de fusión de albúmina de la invención (incluyendo proteínas de fusión que contienen fragmentos o variantes de proteínas terapéuticas y / o albúmina o fragmentos o variantes de albúmina) (volumen total 200 ul). El tampón proteico relevante y el medio solo son los controles. Tras 48 horas de cultivo a 37C, las placas se centrifugan 2 minutos a 1.000 rpm y se retiran 100 ul de sobrenadante y se almacenan a -20 °C para medir la IL-1 (u otras citocinas) si se observa efecto sobre la proliferación. Los pocillos se suplementan con 100 ul de medio con 0,5 uCi de timidina-3H y se cultivan a 37 °C durante 18-24 horas. Los pocillos se recogen y se usa la timidina-3H como medición de la proliferación. El anti-CD3 es el control positivo de la proliferación. La IL-2 (10 U/ml) también se usa como control que potencia la proliferación. El anticuerpo control que no induce proliferación de los linfocitos T se usa como control negativo de los efectos de las proteínas de fusión de la invención.

- 45 **Ejemplo 28: Efecto de las proteínas de fusión de la invención sobre la expresión de MHC DE Clase II. Moléculas coestimuladoras y de adhesión y la diferenciación celular de monocitos y células dendríticas humanas derivadas de monocitos.**

- 50 Las células dendríticas se generan mediante la expansión de la proliferación de precursores que se encuentran en la sangre periférica. Fracciones de monocitos con PBMC adherentes y elutriadas se cultivan durante 7-10 días con GM-CSF (50 ng / ml) e IL-4 (20 ng / ml). Estas células dendríticas tienen el fenotipo característico de células inmaduras (expresión de CD1, CD80, CD86, CD40 y antígenos MHC de clase II). El tratamiento con factores de activación, tales como TNF- $\alpha$ , provoca un rápido cambio en el fenotipo de la superficie (aumento de la expresión de MHC de clase I y II, moléculas coestimuladoras y de adhesión, regulación por disminución de FCyRII, , regulación por incremento de CD83). Estos cambios se correlacionan con un aumento de la capacidad presentadora de antígeno y con la maduración funcional de las células dendríticas.

El análisis FACS de los antígenos de superficie se realiza como sigue. Las células se tratan 1-3 días con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención o LPS (control positivo), se lavan con PBS que contenía 1 % de BSA y azida sódica 0,02 mM y después se incuban con una dilución 1:20 de

anticuerpos monoclonales marcados adecuadamente con FITC o PE durante 30 minutos a 4 grados C. Después de un lavado adicional, las células marcadas se analizan mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

5 Efecto sobre la producción de citocinas. Las citocinas generadas por las células dendríticas, en particular, IL-12, son importantes en el inicio de las respuestas inmunitarias dependientes de células T. La IL-12 influye fuertemente en el desarrollo de la respuesta inmunitaria Th1 los linfocitos T colaboradores e induce linfocitos T citotóxicos células NK. Se usa un ELISA para medir la liberación de IL-12 como sigue. Las células dendríticas ( $10^6$ / ml) se tratan con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención durante 24 horas. Se añade LPS (100 ng / ml) al cultivo celular como control positivo. Los sobrenadantes de los cultivos de células se recogen después y se analiza en contenido en IL-12 usando el kit ELISA comercial (por ejemplo, R & D Systems (Minneapolis.MN)). Se usan los protocolos estándar proporcionados con los kits.

10 Efecto sobre la expresión de moléculas de MHC de clase II, coestimuladoras y de adhesión. Tres familias principales de antígenos de superficie celular se pueden identificar en los monocitos: moléculas de adhesión, moléculas implicadas en la presentación de antígenos y el receptor de Fc. La modulación de la expresión de antígenos de MHC de clase II y otras moléculas coestimuladoras, tales como B7 e ICAM-1, puede resultar en cambios en la capacidad presentadora de antígeno de los monocitos y capacidad de inducir la activación de células T.El aumento de expresión de los receptores Fc se puede correlacionar con la mejora de la actividad citotóxica de monocitos, la liberación de citocinas y fagocitosis.

15 Análisis FACS se usa para examinar los antígenos de superficie como sigue. Los monocitos son tratados 1-5 días con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención o LPS (control positivo), se lavó con PBS que contenía 1 % de BSA y azida sódica 0,02 mM y después se incubaron con una dilución 1:20 de FITC apropiado o PE marcado con anticuerpos monoclonales durante 30 minutos a 4 grados C. Después de un lavado adicional, las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

20 Activación de monocitos y / o aumento de la supervivencia. Los ensayos para moléculas que activan (o alternativamente, inactivan) monocitos y / o aumentan la supervivencia de monocitos (o alternativamente, disminuyen la supervivencia de monocitos) se conocen en la técnica y pueden rutinariamente aplicarse para determinar si una molécula de la invención funciona como inhibidor o activador de los monocitos. Las proteínas de fusión de albúmina de la invención se pueden seleccionar usando los tres ensayos descritos a continuación. Para cada uno de estos ensayos, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se purifican a partir de donantes individuales (Merican Red Cross, Baltimore, MD) mediante centrifugación a través de un gradiente Histopaque (Sigma). Los monocitos se aíslan a partir de PBMC por elutriación centrífuga a contraflujo.

25 Ensayo de supervivencia de monocitos. Los monocitos de sangre periférica humana pierden progresivamente la viabilidad cuando se cultivan en ausencia de scrum o de otros estímulos. Su muerte resulta de procesos regulados internamente (apoptosis). Además del cultivo de los factores de activación, tales como TNF-alfa mejora considerablemente la supervivencia celular y evita la fragmentación del ADN.Yoduro (PI) tinción de propidio se usa para medir la apoptosis como sigue. Los monocitos se cultivan durante 48 horas en tubos de polipropileno en medio (control positivo) sin suero, en presencia de TNF-alfa 100 ng / ml (control negativo) y en presencia de concentraciones variables de la proteína de fusión que se va a analizar. Las células se suspenden a una concentración de  $2 \times 10^6$  ml en PBS que contiene P1 en una concentración final de 5  $\mu$ g / ml y después se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos antes del análisis FACScan. La captación de PI se ha demostrado que se correlaciona con la fragmentación de ADN en este paradigma experimental.

30 Efecto sobre la liberación de citocinas. Una función importante de los monocitos / macrófagos es su actividad reguladora sobre otras poblaciones celulares del sistema inmune a través de la liberación de citocinas después de la estimulación.Un ELISA para medir la liberación de citocinas se realiza como sigue.Monocitos humanos se incubaron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células / ml con concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención y en las mismas condiciones, pero en la ausencia de la proteína de fusión.Para la producción de IL-12, las células se ceban una noche con IFN (100 U / ml) en presencia de la proteína de fusión.LPS (10 ng / ml) se añade a continuación. Los medios condicionados se recogieron después de 24 horas y se mantuvieron congeladas hasta su uso. La medición de TNF-alfa, IL-10, MCP-1 e IL-8 se lleva a cabo a continuación, usando un kit ELISA disponible en el mercado (por ejemplo, R & D Systems (Mirmneapolis, MN)) y la aplicación de los protocolos estándar proporcionados con el kit.

35 Descarga oxidativa. Los monocitos purificados siembran en una placa de 96 pocillos a  $2-1 \times 10^5$  células / pocillo. Se añaden concentraciones crecientes de una proteína de fusión de albúmina de la invención a los pocillos en un volumen total de 0,2 ml de medio de cultivo (RPMI 1640 + 10 % de FCS, glutamina y antibióticos).Después de 3 días de incubación, las placas se centrifugaron y se retira el medio de los pocillos. Para las monocapas de macrófagos, se añaden 0,2 ml por pocillo de solución de rojo fenol (NaCl 140 mM, 10 mM de tampón de fosfato de potasio pH 7,0, 5,5 mM de dextrosa, fenol 0,56 mM rojo y 19 U / ml de HRPO), junto con el estimulante ( 200 nM PMA).Las placas se incuban a 37 ° C durante 2 horas y la reacción se detiene añadiendo 20  $\mu$ l de NaOH 1 N por pocillo. La absorbancia se lee a 610 nm. Para calcular la cantidad de  $H_2O_2$  producida por los macrófagos se efectúa una curva

estándar de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de molaridad conocida para cada experimento.

### **Ejemplo 29: Efectos biológicos de las proteínas de fusión de la invención.**

#### Ensayos con astrocitos y neuronas

5 En las proteínas de fusión de albúmina de la invención se analiza la actividad en la estimulación de la supervivencia, el sobrecrecimiento de neuritas o la diferenciación fenotípica de células neuronales corticales y para inducir la proliferación de células inmunopositivas para la proteína ácida fibrilar de glía, los astrocitos. La selección de células corticales para el bioensayo se basa en la expresión prevalente de FGF-1 y FGF-2 en estructuras corticales y en la potenciación notificada previamente sobre la supervivencia neuronal cortical resultante del tratamiento con FGF-2. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de incorporación de timidina para elucidar una proteína de fusión de albúmina de la actividad de la invención con estas células.

10 Además, informes previos que describen los efectos biológicos de FGF-2 (FGF básico) sobre neuronas corticales o del hipocampo han demostrado *in vitro* incrementos de la supervivencia de las neuronas y del sobrecrecimiento de las neuritas (Walicke et al., "Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3012 - 3016. (1986), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad). No obstante, los informes de experimentos realizados con células PC-12 sugieren que estas dos respuestas no son necesariamente sinónimas y pueden depender de no solo qué FGF se está tratando sino también sobre qué receptor(es) se expresan en las células diana. Usando el paradigma del cultivo neuronal cortical primario, la capacidad de una proteína de fusión de albúmina de la invención para inducir el sobrecrecimiento de neuritas se puede comparar con la respuesta alcanzada con FGF-2 usando, por ejemplo, un ensayo de incorporación de timidina.

#### Ensayos en fibroblastos y células endoteliales

25 Los fibroblastos pulmonares humanos se obtienen en Clonetics (San Diego, CA) y se mantienen en medio de crecimiento de Clonetics. Las células endoteliales microvasculares dérmicas se obtienen de Cell Applications (San Diego, CA). Para los ensayos de proliferación, los fibroblastos pulmonares humanos y las células endoteliales microvasculares dérmicas se pueden cultivar a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día en medio de crecimiento. Después, las células se incuban durante un día en medio basal de BSA al 0,1 % Después de sustituir el medio con medio de BSA al 0,1 % fresco, las células se incuban con la proteína de fusión de ensayo de las proteínas de invención durante 3 días. A cada pocillo se añade Alamar Blue (Alamar Biosciences, Sacramento, CA) hasta una concentración final del 10 %. Las células se incuban durante 4 horas. La viabilidad celular se mide leyendo en un lector de fluorescencia CytoFluor. Para los ensayos de PGE<sub>2</sub>, los fibroblastos pulmonares humanos se cultivan a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día. Después de un cambio de medio a medio basal de BSA al 0,1 %, las células se incuban con FGF-2 o la proteína de fusión de la invención con o sin IL-1α durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogen y se analiza la PGE<sub>2</sub> mediante el kit EIA (Cayman, Ann Arbor, MI). Para los ensayos de IL-6, los fibroblastos pulmonares humanos se cultivan a 5.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos durante un día. Después de un cambio de medio a medio basal de BSA al 0,1 %, las células se incuban con FGF-2 o con o sin una proteína de fusión de albúmina de la invención y/o IL-1α durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogen y se analiza la IL-6 mediante el kit ELISA (Endogen, Cambridge, MA).

40 Los fibroblastos pulmonares humanos se cultivan con FGF-2 p con proteína de fusión de albúmina de la invención durante 3 días en medio basal antes de la adición de Alamar Blue para evaluar los efectos sobre el crecimiento de fibroblastos. FGF-2 deberá mostrar una estimulación a 10 - 2500 ng/ml que se puede usar para comparar la estimulación con la proteína de fusión de la invención

#### Proliferación celular basada en incorporación de timidina-[<sup>3</sup>H]

45 El siguiente ensayo de incorporación de timidina-[<sup>3</sup>H] se puede usar para medir el efecto de una proteína terapéutica, por ejemplo proteínas factores de crecimiento, sobre la proliferación de células tales como células fibroblastos, células epiteliales o células musculares inmaduras.

50 Los cultivos subconfluentes se detienen en la fase G1 mediante una incubación de 18 horas en medio sin suero. Después se añaden proteínas terapéuticas durante 24 horas y durante las últimas 4 horas, los cultivos se marcan con timidina-[<sup>3</sup>H] a una concentración final de 0,33 μM (25 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL). La timidina-[<sup>3</sup>H] incorporada se precipita con ácido tricloroacético al 10 % helado durante 24 horas. Después, las células se aclaran secuencialmente con ácido tricloroacético al 10 % helado y después, con agua helada. Tras la lisis en NaOH 0,5 M, los lisados y aclarados con PBS (500 ml) se combinan y se mide la cantidad de radioactividad.

#### Modelos de Parkinson

55 La pérdida de función motora en la enfermedad de Parkinson se atribuye a una deficiencia de dopamina del estrato resultante de la degeneración de las neuronas de proyección dopaminérgicas nigroestriales. Un modelo animal de Parkinson que se ha caracterizado ampliamente implica la administración sistémica de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). En el SNC, el MPTP es captado por los astrocitos y catabolizado por la monoamino

oxidasa B en 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>) y se libera. Posteriormente, el MPP<sup>+</sup> se acumula de forma activa en las neuronas dopaminérgicas mediante el transportador para dopamina de recaptación de alta afinidad. Después, el MPP<sup>+</sup> se concentra en las mitocondrias mediante el gradiente electroquímico e inhibe de forma selectiva la nicotinamida adenina disfosfato: ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), de modo que interfiere con el transporte de electrones y en último término, genera radicales de oxígeno.

Se ha demostrado en paradigmas de cultivo tisular que el FGF-2 (FGF básico) tiene actividad trófica hacia las neuronas dopaminérgicas nigrales (Ferrari et al., Dev. Biol. 1989). Recientemente, el grupo del Dr. Unsicker ha demostrado que la administración de FGF-2 en implantes de espuma de gel en el estrato tiene como resultado la protección casi completa de las neuronas dopaminérgicas nigricas frente a la toxicidad asociada con la exposición a MPTP (Otto and Unsicker, J. Neuroscience, 1990).

Basándose en los datos con FGF-2, una proteína de fusión de albúmina de la invención se puede evaluar para determinar si tiene una acción similar a la de FGF-2 en la potenciación de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas *in vitro* y también se pueden analizar *in vivo* para determinar la protección de las neuronas dopaminérgicas en el estrato frente al daño asociado con el tratamiento con MPTP. El potencial efecto de una proteína de fusión de albúmina de la invención se examina primero *in vitro* en un paradigma de cultivo celular neuronal dopaminérgico. Los cultivos se preparan diseccionando la placa del suelo del mesencéfalo del día 14 de la gestación de embriones de rata Wistar. El tejido se disocia con tripsina y se siembra a una densidad de 200.000 células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos de cristal recubiertos con poliornitina-laminina. Las células se mantienen en medio Eagle modificado de Dulbecco y medio F12 que contiene suplementos hormonales (N1). Los cultivos se fijan con paraformaldehído tras 8 días *in vitro* y se procesan para la tirosina hidroxilasa, un marcador específico para neuronas dopaminérgicas, tinción inmunohistoquímica. Los cultivos de células disociadas se preparan a partir de embriones de rata. El medio de cultivo se cambia cada tres días y los factores también se añaden en ese momento.

Dado que las neuronas dopaminérgicas se aíslan de animales en el día 14 de la gestación, un tiempo de desarrollo que ha pasado la etapa en la que las células precursoras dopaminérgicas están proliferando, un incremento en el número de neuronas inmunopositivas para tirosina hidroxilasa representaría un incremento en el número de neuronas dopaminérgicas que sobreviven *in vitro*. Por tanto, si una proteína terapéutica de la invención actúa prolongando la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, se sugeriría que la proteína de fusión puede estar implicada en la enfermedad de Parkinson.

#### **Ejemplo 30: El efecto de las proteínas de fusión de albúmina de la invención sobre el crecimiento de las células endoteliales vasculares.**

El día 1, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se siembran a 2-5x10<sup>4</sup> células/35 mm a una densidad en medio M199 que contiene 4 de suero bovino fetal (FBS), 16 unidades/ml de heparina y 50 unidades/ml de suplementos de crecimiento de células endoteliales. El día 2, el medio se sustituye con M199 que contiene 10 % de FBS, 8 unidades/ml de heparina. Una proteína de fusión de albúmina de la invención y se añaden los controles positivos, tales como VEGF y FGF básico (bFGF) a concentraciones variables. Los días 4 y 6, se sustituye el medio. El día 8 se determina el número de células con un contador Coulter.

Un incremento en el número de células HUVEC indica que la proteína de fusión puede proliferar las células endoteliales vasculares, mientras que una disminución del número de células HUVEC indica que la proteína de fusión inhibe las células endoteliales vasculares.

#### **Ejemplo 31: Modelo de cicatrización de heridas en la córnea de rata.**

Este modelo animal muestra el efecto de una proteína de fusión de albúmina de la invención en la neovasularización. El protocolo experimental incluye:

Realizar una incisión de 1-1,5 de longitud desde el centro de la córnea hacia la capa estromal.

Insertar espátula por debajo del borde de la incisión mirando a la esquina exterior del ojo.

Realizar una bolsa (su base es de 1-1,5 mm desde el borde del ojo).

Colocar una pastilla que contiene 50ng- 5 ug de una proteína de fusión de albúmina de la invención, dentro de la bolsa.

El tratamiento con un proteínas de fusión de una albúmina de la invención también se puede aplicar tópicamente a las heridas de la córnea en un intervalo de dosificación de 20 mg - 500 mg (tratamiento diario durante cinco días).

#### **Ejemplo 32: Modelos de cicatrización de heridas alterada por glucocorticoides y ratón diabético.**

##### *Modelo de ratón db+/db+ diabético*

Para demostrar que una proteína de fusión de albúmina de la invención acelera el proceso de cicatrización se usa el modelo de cicatrización de heridas en ratón diabético genéticamente. El modelo de cicatrización de heridas en ratón

diabético de espesor completo en ratón db+/db+ es un modelo bien caracterizado, clínicamente relevante y reproducible de la cicatrización de heridas alterada. La cicatrización de heridas en diabéticos depende de la formación de tejido de granulación y reepitelialización más que contracción (Gartner, M.H. et al., J. Surg. Res. 52:389 (1992); Greenhalgh, D.G. et al., Am. J. Pathol. 136:1235 (1990)).

5 Los animales diabéticos tienen muchos de los rasgos característicos observados en la diabetes mellitus de tipo II. Los ratones homocigotos (db+/db+) son obesos en comparación con sus hermanos de camada heterocigotos (db+/-m) normales. Los ratones diabéticos mutantes (db+/db+) tienen una única mutación autosómica recesiva en el cromosoma 4 (db+) (Coleman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:283293 (1982)). Los animales muestran polifagia, polidipsia y poliuria. Los ratones diabéticos mutantes (db+/db+) presentan niveles elevados de glucosa en sangre, niveles de insulina incrementados o normales y supresión de la inmunidad celular (Mandel et al., J. Immunol. 120:1375 (1978); Debray-Sachs, M. et al., Clin. Exp. Immunol. 51(1):17 (1983); Leiter et al., Am. J. of Pathol. 114:46 - 55 (1985)). En estos animales se ha descrito neuropatía periférica, complicaciones miocárdicas y lesiones microvasculares, espesamiento de la membrana basal y anomalías en la filtración glomerular (Norido, F. et al., Exp. Neurol. 83(2):221232 (1984); Robertson et al., Diabetes 29(1):6067 (1980); Giacomelli et al., Lab Invest. 40(4):460-473 (1979); Coleman, D.L., Diabetes 31 (Suppl):16 (1982)). Estos ratones diabéticos homocigotos desarrollan hiperglucemia que es resistente a los análogos de la insulina de la diabetes de tipo II humana (Mandel et al., J. Immunol. 120:13751377 (1918)).

Las características observadas en estos animales sugieren que la cicatrización en este modelo puede ser similar a la cicatrización observada en la diabetes humana (Greenhalgh, et al., Am. J. of Pathol. 136:1235 - 1246 (1990)).

20 En este estudio se usan ratones hembra diabéticas genéticamente C57BL/KsJ (db+/db+) y sus hermanos de camada heterocigotos no diabéticos (db+/-m) (Jackson Laboratories). Los animales se adquieren a las 8 semanas de edad y al comienzo de estudio tienen 9 semanas de edad. Los animales se enjaulan individualmente y se les ofrece agua y alimentos a demanda. Todas las manipulaciones se realizan usando técnicas asépticas. Los experimentos se realizan de acuerdo con las normas y guías del Human Genome Sciences, Inc. Institutional Animal Care y el Use Committee and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

30 El protocolo de formación de heridas se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos indicados anteriormente (Tsuboi, R. and Rifkin, D.B., J. Exp. Med. 172:245251 (1990)). Brevemente, el día de la realización de la herida, se anestesia a los animales con una inyección intraperitoneal de avertina (0,01 mg/ml), 2,2,2-tribromoetanol y 2-metil-2-butanol disueltos en agua desionizada. Se afeita la región dorsal del animal y se lava la piel con una solución de etanol al 70 % y yodo. El área quirúrgica se seca con una gasa estéril antes de la formación de heridas. A continuación se crea una herida de 8 mm de espesor completa usando un perforador de tejido Keyes. Inmediatamente después de la formación de la herida, la piel circundante se estira suavemente para eliminar la expansión de la herida. Las heridas se dejan abiertas durante todo el experimento. La aplicación del tratamiento se realiza tópicamente durante 5 días consecutivos comenzando el día de la formación de la herida. Antes del tratamiento, las heridas se limpian suavemente con solución salina estéril y esponjas de gasa.

Las heridas se examinan visualmente y se fotografían a una distancia fija el día de la cirugía y después a intervalos de dos días. El cierre de la herida se determina mediante medición diaria los días 1 - 5 y el día 8. Las heridas se miden horizontalmente y verticalmente usando un compás de Jameson calibrado. Las heridas se consideran curadas si ya no se tejido de granulación y la herida está cubierta con un epitelio continuo.

40 Una proteína de fusión de albúmina de la invención se administra usando una serie de dosis diferentes, desde 4 mg a 500 mg, por herida al día durante 8 días en vehículo. Los grupos control con vehículo recibieron 50 ml de la solución vehículo.

45 Se sacrifica a los animales el día 8 con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (300 mg/kg). A continuación se recogen las heridas y la piel circundante para análisis histológicos e inmunohistoquímicos. Las muestras de tejido se introducen en formalina tamponada neutra al 10 % en casetes de tejido entre las esponjas de biopsia para su posterior procesamiento.

Se evalúan tres grupos de 10 animales cada uno (5 diabéticos y 5 controles no diabéticos). 1) Vehículo control placebo, 2) grupo no tratado y 3) grupo tratado.

50 El cierre de heridas se analiza midiendo el área en el eje vertical y horizontal y obteniendo el área cuadrada total de la herida. Después se estima la contracción estableciendo las diferencias entre el área de la herida inicial (día 0) y el de después del tratamiento (día 8). El área de la herida el día 1 es de 64 mm<sup>2</sup>, el tamaño correspondiente de la perforación dérmica. Los cálculos se realizan usando la fórmula siguiente:

$$a. [\text{área abierta el día 8}] - [\text{área abierta el día 1}] / [\text{área abierta el día 1}]$$

55 Las muestras se fijan en formalina tamponada al 1 % e incluidos en bloques de parafina se seccionan perpendicularmente a la superficie de la herida (5 mm) y se cortan usando un microtomo Reichert-Jung. Se realiza una tinción de rutina de hematoxilina-eosina (H y E) en secciones transversales de heridas diseccionadas. La exploración histológica de las heridas se usa para evaluar si el proceso de cicatrización y el aspecto morfológico de

la piel reparada se alteran por el tratamiento con una proteína de fusión de albúmina de la invención. Esta evaluación incluyó la verificación de la presencia de acumulación celular, las células inflamatorias, los capilares, los fibroblastos, la reepitelialización y la madurez epidérmica (Greenhalgh, D.G. et al., Am. J. Pathol. 136:1235 (1990)). Un observador enmascarado usa un micrómetro de lente calibrado.

- 5 Las secciones de tejido también se tiñen inmunohistoquímicamente con un anticuerpo policlonal anti-queratina humana de conejo usando el sistema de detección ABC Elite. La piel humana se usa como control tisular positivo, mientras que como control negativo se usa IgG no inmunitaria. El crecimiento de queratinocitos se determina evaluando la extensión de la reepitelización de la herida usando un micrómetro de lente calibrada.

- 10 La proliferación celular con antígeno nuclear/ciclina (PCNA) en muestras de piel se demuestra usando un anticuerpo anti-PCNA (1:50) con un sistema de detección ABC Elite El cáncer de colon humano sirvió como control tisular positivo y el tejido cerebral humano se usa como control negativo. Cada muestra incluyó una sección con omisión del anticuerpo primario y sustitución con IgG de ratón no inmunitaria. La clasificación de estas secciones se basa en la extensión de la proliferación en una escala de 08, el lado inferior de la escala refleja la ligera proliferación y el lado superior refleja la proliferación intensa.

- 15 Los datos experimentales se analizan usando una prueba t no pareada. Un valor de  $p < 0,05$  se considera significativo.

#### *Modelo de ratas con alteración por esteroides*

- 20 La inhibición de la cicatrización de heridas con esteroides está bien documentada en varios sistemas *vitro* e *in vivo* (Wahl, Glucocorticoids and Wound healing. En: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects. 280302 (1989); Wahlet al., J. Immunol. 115: 466 - 481 (1975); Werb et al., J. Exp. Med. 147:16841694 (1978)). Los glucocorticoides retrasan la cicatrización de heridas inhibiendo la angiogénesis, disminuyendo la permeabilidad vascular (Ebert et al., An. Intern. Med. 37:701705 (1952)), la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (Beck et al., Growth Factors. 5: 295 - 304 (1991); Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703797 (1978)) y produciendo una reducción transitoria de los monocitos en circulación (Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703 - 797 (1978); Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", En: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, pp. 280 - 302 (1989)). La administración sistémica de esteroides para alterar la cicatrización de heridas es un fenómeno bien establecido en ratas (Beck et al., Growth Factors. 5: 295 - 304 (1991); Haynes et al., J. Clin. Invest. 61: 703 - 797 (1978); Wahl, "Glucocorticoids and wound healing", En: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, pp. 280302 (1989); Pierce et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2229 - 2233 (1989)).

Para demostrar que una proteína de fusión de albúmina de la invención puede acelerar el proceso de cicatrización, se evalúan los efectos de múltiples aplicaciones tópicas de la proteína de fusión sobre las heridas de la piel de espesor completo producidas por escisión en ratas en las que se ha alterado la cicatrización mediante la administración sistémica de metilprednisolona.

- 35 En este ejemplo se usan ratas macho adultas Sprague-Dawley de 250 - 300 g de peso (Charles River Laboratories). Los animales se adquieren a las 8 semanas de edad y al comienzo de estudio tienen 9 semanas de edad. La respuesta de cicatrización de las ratas se ve alterada por la administración sistémica de metilprednisolona (17 mg/kg/rata por vía intramuscular) en el momento de la formación de la herida. Los animales se enjaulan individualmente y se les ofrece agua y alimentos a demanda. Todas las manipulaciones se realizan usando técnicas asépticas. El estudio se realiza de acuerdo con las normas y guías del Human Genome Sciences, Inc. Institutional Animal Care y el Use Committee and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

- 45 Se sigue el protocolo de formación de heridas de acuerdo con lo descrito anteriormente. El día de la formación de heridas se anestesia a los animales con una inyección intramuscular de ketamina (50 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg). Se afeita la región dorsal del animal y se lava la piel con una solución de etanol al 70 % y yodo. El área quirúrgica se seca con una gasa estéril antes de la formación de heridas. A continuación se crea una herida de 8 mm de espesor completa usando un perforador de tejido Keyes. Las heridas se dejan abiertas durante todo el experimento. La aplicación de los materiales de ensayo se administra tópicamente una vez al día durante 7 días consecutivos comenzando el día de la formación de la herida y después de la administración de metilprednisolona. Antes del tratamiento, las heridas se limpian suavemente con solución salina estéril y esponjas de gasa.

- 50 Las heridas se examinan visualmente y se fotografían a una distancia fija el día de la formación de heridas y al final del tratamiento. El cierre de la herida se determina mediante medición diaria los días 1 - 5 y el día 8. Las heridas se miden horizontalmente y verticalmente usando un compás de Jameson calibrado. Las heridas se consideran curadas si ya no se tejido de granulación y la herida está cubierta con un epitelio continuo.

- 55 La proteína de fusión de la invención se administra usando una serie de dosis diferentes, desde 4 mg a 500 mg, por herida al día durante 8 días en vehículo. Los grupos control con vehículo recibieron 50 ml de la solución vehículo.

Se sacrifica a los animales el día 8 con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (340 mg/kg). A continuación se recogen las heridas y la piel circundante para análisis histológicos. Las muestras de tejido se

introducen en formalina tamponada neutra al 10 % en casetes de tejido entre las esponjas de biopsia para su posterior procesamiento.

Se evalúan tres grupos de 10 animales cada uno (5 con metilprednisolona y 5 son glucocorticoides). 1) Grupo son tratar, 2) vehículo control placebo 3) grupos tratados.

5 El cierre de heridas se analiza midiendo el área en el eje vertical y horizontal y obteniendo el área total de la herida. Después se estima el cierre estableciendo las diferencias entre el área de la herida inicial (día 0) y el de después del tratamiento (día 8). El área de la herida el día 1 es de 64 mm<sup>2</sup>, el tamaño correspondiente de la perforación dérmica. Los cálculos se realizan usando la fórmula siguiente:

a. [área abierta el día 8] – [área abierta el día 1] / [área abierta el día 1]

10 Las muestras se fijan en formalina tamponada al 1 % e incluidos en bloques de parafina se seccionan perpendicularmente a la superficie de la herida (5 mm) y se cortan usando un microtomo Olympus. Se realiza una tinción de rutina de hematoxilina-eosina (H y E) en secciones transversales de heridas diseccionadas. La exploración histológica de las heridas permite evaluar si el proceso de cicatrización y el aspecto morfológico de la piel reparada mejoran con el tratamiento con una proteína de fusión de albúmina de la invención. Un observador enmascarado usa un micrómetro de lente calibrado para determinar la distancia del espacio de la herida.

Los datos experimentales se analizan usando una prueba t no pareada. Un valor de p < 0,05 se considera significativo.

### Ejemplo 33: Modelo animal de linfedema.

20 El propósito de este enfoque experimental es crear un modelo de linfedema apropiado y compatible para analizar los efectos terapéuticos de una proteína de fusión de albúmina de la invención en la linfangiogénesis y el reestablecimiento del sistema circulatorio linfático en la extremidad trasera de rata. La eficacia se mide mediante el volumen de hinchazón de la extremidad afectada, cuantificación de la cantidad de vasculatura linfática, proteína plasmática total en sangre y la histopatología. Se observó linfedema agudo durante 7-10 días. Quizás lo más importante, se realiza un seguimiento de la evolución crónica del edema durante hasta 3-4 semanas.

25 Antes de comenzar la cirugía, se extrae una muestra de sangre para el análisis de la concentración de proteínas. Las ratas macho que pesaban aproximadamente ~350g reciben pentobarbital. Posteriormente, las piernas derechas se afeitan desde la rodilla hasta la cadera. El área afeitada se limpia con una gasa empapada en EtOH al 70 %. La sangre se extrae para la prueba de proteínas totales en suero. Las mediciones de la circunferencia y volumétricas se hacen antes de inyectar medio de contraste en las patas después de marcar 2 niveles de medición (0,5 cm por encima Heel, en medio de la pata dorsal). En el dorso intradérmico de las patas derecha e izquierda se inyecta azul de 0,05 ml de 1 % Evan. Las mediciones de la circunferencia y volumétricas se realizan después de la inyección o pigmento en las patas.

35 Usando la articulación de la rodilla como marca, se realiza una incisión inguinal circunferencial en el medio de la pata, lo que permite localizar los vasos femorales. Se usan pinzas y hemostatos para diseccionar y separar las aletas de piel. Después de localizar es los vasos femorales, se ubica el vaso linfático que corre a lo largo de lado y por debajo del/de los vaso(s). Los principales vasos linfáticos en esta área se coagulan eléctricamente o se ligan con sutura.

40 Usando un microscopio, los músculos de la espalda de la pierna (cerca del semitendinoso y los aductores) se diseccionan sin puntas. Después se localiza en ganglio linfático poplíteo. Los 2 vasos linfático proximales y los 2 distales y la irrigación sanguínea distal del ganglio poplíteo se ligan mediante sutura. El ganglio linfático poplíteo y cualquier tejido adiposo acompañante se retiran a continuación cortando los tejidos conjuntivos.

45 Hay que tener cuidado para controlar cualquier sangrado leve como consecuencia de este procedimiento. Después de los linfáticos se ocluyen, los colgajos de piel se sellan usando piel líquida (Vetbond) (AJ Buck). Los bordes separados de la piel se escalan al tejido muscular subyacente mientras dejando un espacio de ~ 0,5 cm alrededor de la pierna. La piel también se puede anclar mediante sutura al músculo subyacente cuando es necesario.

50 Para evitar la infección, los animales se alojan individualmente con una rejilla (sin lecho). Los animales que malla que se recuperan se comprueban todos los días a través del pico edematoso óptima, que por lo general se produjo el día 5-7. A continuación, se observa el pico edematoso meseta. Para evaluar la intensidad del linfedema, se miden la circunferencia y los volúmenes de 2 lugares designados en cada pata antes de la operación y diariamente durante 7 días. Se determina el efecto de las proteínas plasmáticas sobre el linfedema y también se investiga si el análisis de proteínas es un perímetro de prueba útil. Los pesos de los miembros tanto control y edematosos se evalúan en 2 lugares. El análisis se realiza siguiendo un patrón ciego.

55 Mediciones de la circunferencia: Con una breve anestesia con gas para prevenir el movimiento de las extremidades, se usa una cinta de tela para medir la circunferencia de la extremidad. Las mediciones se realizan en el hueso del tobillo y la pata dorsal por 2 personas diferentes y esas 2 lecturas se promedian. Las lecturas se toman para las

extremidades control y las extremidades edematosas.

5 Medidas volumétricas: El día de la cirugía, se anestesia a los animales con pentobarbital y se analizan antes de la cirugía. Para las volumetrías diarias los animales están bajo una breve anestesia con halotano (inmovilización rápida y recuperación rápida) y las dos patas se afeitan e se marcan igual usando un rotulador indeleble en las patas. Las patas se sumergen primero en agua, después se sumergen en el instrumento a cada nivel marcado y luego se mide mediante el software de edema Buxco (Chen / Víctor). Los datos los registran por una sola persona, mientras que la otra coloca la extremidad por la zona marcada.

Mediciones de las proteínas de la sangre-plasma: la sangre se extrae, se centrifuga y se separa el suero antes de la cirugía y después al final para la comparación entre la proteína total y el  $Ca^{2+}$ .

10 Comparación del peso de las extremidades: Después de la extracción de sangre, el animal está preparado para la recogida de tejidos. Las extremidades se amputan usando una guillotina, después, las patas, tanto experimentales como control se cortan por el ligamento y se pesan. Se realiza una segunda determinación del peso cuando la articulación tibio-calcaneal es desarticulada y el pie se pesa.

15 Preparaciones histológicas: El músculo transverso situado detrás de la zona de la rodilla (poplíteo) se resecta y se coloca en un molde de metal, lleno de freezeGel, sumergido en metilbutano frío, colocado en bolsas de muestra marcadas en - 80EC hasta cortar. Después de cortarlo, se observan los vasos linfáticos del músculo con microscopio fluorescente.

#### **Ejemplo 34: Supresión de la expresión de la molécula de adhesión inducida por TNF-alfa por una proteína albúmina fusión de la invención**

20 El reclutamiento de linfocitos en áreas de inflamación y angiogénesis implica interacciones ligando-receptor específicas entre las moléculas de adhesión a la superficie celular (CAM) sobre linfocitos y el endotelio vascular. El proceso de adhesión, en contextos normales y patológicos, sigue una cascada de múltiples etapas en la que participan la expresión de la molécula 1 de adhesión celular (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la molécula 1 de adhesión leucocitaria endotelial (E-selectina) en células endoteliales (EC). La expresión de estas moléculas y de otras sobre el endotelio vascular determina la eficiencia con la que los leucocitos se pueden adherir a la vasculatura local y extravasar al tejido local durante el desarrollo de una respuesta inflamatoria. La concentración local de citocinas y del factor de crecimiento participa en la modulación de la expresión de estas CAM.

25 El factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), una potente citocina proinflamatoria, es un estimulador de las tres CAM en las células endoteliales y puede estar implicado en una amplia variedad de respuestas inflamatorias, resultando a menudo en un resultado patológico.

30 El potencial de una proteína de fusión de la albúmina de la invención para mediar en la supresión de la expresión de CAM inducida por TNF- $\alpha$  se puede analizar. Un ensayo de ELISA modificado que usa EC como absorbente de fase sólida se emplea para medir la cantidad de expresión de CAM en EC tratados con TNF- $\alpha$  cuando se coestimulan con un miembro de la familia de proteínas de los FGF.

35 Para realizar el experimento, las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se obtienen a partir de cultivos de cosechas de cordón agrupados y se mantenidas en medio de crecimiento (EGM-2; Clonetics, San Diego, CA) suplementado con 10 % de FCS y 1 % de penicilina / estreptomina en un incubador humidificado a 37 °C y 5 % de  $CO_2$ . Las HUVEC se siembran en placas de 96 pocillos a concentraciones de  $1 \times 10^4$  células / pocillo en medio EGM a 37 grados C durante 18-24 horas o hasta la confluencia. Las monocapas se lavan posteriormente 3 veces con una solución de medio RPMI-1640 sin suero suplementado con 100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomina y se tratan con una citocina dada y / o factor (s) de crecimiento de 24 a 37 grados C. Después de la incubación, las células se evalúan para determinar la expresión de CAM.

40 Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se cultivan en una placa de 96 pocillos convencional hasta confluencia. Se retira el medio de crecimiento de las células y se reemplaza con 90  $\mu$ l de medio 199 (10 % FBS). Las muestras para la prueba y los controles positivos o negativos se añaden a la placa por triplicado (en volúmenes de 10  $\mu$ l). Las placas se incuban a 37 °C durante 5 horas (expresión de selectina y de integrina) o 24 horas (solo expresión de integrina). Las placas se aspiran para eliminar el medio y a cada pocillo se añaden 100  $\mu$ l de 0,1 % de paraformaldehído – PBS (con  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ ). Las placas se mantienen a 4 °C durante 30 minutos.

45 A continuación se retira el fijador de los pocillos y los pocillos se lavan IX con PBS (+ Ca, Mg) + BSA al 0,5 % y se drena. No permita que los pocillos se sequen. Se añaden 10  $\mu$ l de anticuerpo primario diluido a los pocillos de ensayo y control. Se usan Anti-ICAM-1-Biotina, Anti-VCAM-1-Biotina y Anti-E-selectina-Biotina a una concentración de 10  $\mu$ g/ml (dilución 1:10 de 0,1 mg/ml de anticuerpo madre). Las células se incuban a 37 °C durante 30 minutos en un ambiente humidificado. Los pocillos se lavan tres veces con PBS(+Ca,Mg) + +0,5 % de BSA.

50 A cada pocillo se añaden 20  $\mu$ l de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida (dilución 1:5.000) y se incuban a 37 °C durante 30 minutos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS (+Ca,Mg) + 0,5 % de BSA. Se disuelve un comprimido de p-nitrofenol fosfato pNPP por 5 ml de tampón de glicina (pH 10,4). A cada pocillo de ensayo se



añaden 100 µl de sustrato pNPP en tampón de glicina. Los pocillos estándar por triplicado se preparan a partir de la dilución de trabajo de estreptavidina-fosfatasa alcalina en tampón de glicina: 1:5.000 ( $10^0$ ) >  $10^{-0.5}$  >  $10^{-1}$  >  $10^{-1.5}$ . 5 µl de cada dilución se añaden a los pocillos por triplicado y el contenido en AP resultante es de 5,50 ng, 1,74 ng, 0,55 ng, 0,18 ng. Después, a cada uno de los pocillos convencionales se deben añadir 100 µl del reactivo pNPP. La placa se incuba a 37 °C durante 4 horas. A todos los pocillos se añade un volumen de 50 µl de NaOH 3M. Los resultados se cuantifican en un lector de placas a 405 nm. La opción de sustracción de fondo se usa en pocillos de blanco llenas de solo tampón glicina. Se establece la plantilla para indicar la concentración del conjugado-AP en cada pocillo estándar [ 5,50 ng; 1,74 ng; 0,55 ng; 0,18 ng]. Los resultados se indican como la cantidad de conjugado-AP unido en cada muestra.

10 **Ejemplo 35: Construcción de la construcción indicadora GAS**

Una vía de transducción de señal implicada en la diferenciación y proliferación de las células se denomina la vía Jaks-STAT. Las proteínas activadas en la vía Jaks-STAT se unen a los elementos "GAS" del sitio de activación gamma o al elemento respondedor sensible al interferón ("ISRE") localizados en el promotor de muchos genes. La unión de una proteína a estos elementos altera la expresión del gen asociado.

15 Los elementos GAS e ISRE son reconocidos por una clase de factores de transcripción denominados transductores de señal y activadores de la transcripción o "STAT". Existen seis miembros de la familia STAT. Stat1 y Stat3 están presentes en muchos tipos de células como Stat2 (dado que la respuesta al IFN-alfa es amplia). Stat4 es más restringida y no está en muchos tipos de células, aunque se ha encontrado en las células T colaboradoras de clase I tras el tratamiento con IL-12. Stat5 se denominó inicialmente factor de crecimiento de mamíferos, pero se ha encontrado a concentraciones más altas en otras células, incluido en células mieloides. Se puede activar en células de cultivo tisular mediante muchas citocinas.

20 Las STAT se activan para translocarse desde el citoplasma al núcleo tras la fosforilación de la tirosina mediante un conjunto de quinasas conocidas como la familia de Janus quinasas ("Jaks"). Las Jaks representan una familia distinta de tirosina quinasas solubles e incluyen Tyk2, Jak1, Jak2 y Jak3. Estas quinasas muestran una similitud de secuencia significativa y en general están catalíticamente inactivas en las células en reposo.

25 Las Jaks se activan mediante una amplia gama de receptores resumidos en la Tabla siguiente. (Adaptado de la revisión de Schidler and Darnell, Ann. Rev. Biochem. 64:62151 (1995)). Una familia de receptores de citocinas capaz de activar Jaks se divide en dos grupos: a) la clase 1 incluye los receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, Epo, PRL, GH, G-CSF, GM-CSF, LIF, CNTF y trombopoyetina; y (b) Clase 2 incluye IFN-a, IFN-g e IL-10. Los receptores de la clase 1 comparten un motivo de cisteína conservado (un conjunto de cuatro cisteínas conservadas y un triptófano) y un motivo WSXWS (una región proximal a la membrana que codifica Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (SEC ID N° 1113)).

30 Por tanto, al unirse un ligando a un receptor se activan las Jaks, que, a su vez, activan las STAT, que después se translocan y se unen a los elementos GAS. La totalidad de este proceso está dentro de la vía de transducción de señal Jaks-STAT. Por tanto, la activación de la vía de Jaks-STAT, que se refleja mediante la unión del elemento GAS o ISRE, se puede usar para indicar las proteínas implicadas en la proliferación y diferenciación de células. Por ejemplo, se muestra que los factores de crecimientos y las citocinas activan la vía de Jaks-STAT (véase la Tabla 5, más adelante). Por tanto, usando los elementos GAST unidos a moléculas indicadoras se pueden identificar los activadores de la vía Jaks-STAT.

40 **Tabla 5**

JAK	ESTATS				(elementos) GAST o ISRE	
	tyk2	Jak1	Jak2	Jak3		
Ligando						
<u>Familia de IFN</u>						
IFN-a/B	+	+	-	-	1,2,3	ISRE
IFN-g		+	+	-	1	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
Il-10	+	?	?	-	1,3	
<u>Familia de gp130</u>						
IL-6 (Pleiotrópica)	+	+	+	?	1,3	GAS(IRF1>Lys6>IFP)
IL-11 (Pleiotrópica)	?	+	?	?	1,3	
OnM(Pleiotrópica)	?	+	+	?	1,3	

ES 2 545 090 T3

LIF(Pleiotrópica)	?	+	+	?	1,3	
CNTF(Pleiotrópica)	-/+	+	+	?	1,3	
G-CSF(Pleiotrópica)	?	+	?	?	1,3	
IL-12 (Pleiotrópica)	+	-	+	+	1,3	
<u>Familia de g-C</u>						
IL-2 (linfocitos)	-	+	-	+	1,3,5	GAS

(continuación)

JAK	ESTATS				(elementos) GAST o ISRE	
IL-4 (linfocitos/mieloides)	-	+	-	+	6	GAS(IRF1=IFP>>Ly6)(IgH)
IL-7 (linfocitos)	-	+	-	+	5	GAS
IL-9 (linfocitos)	-	+	-	+	5	GAS
IL-13 (linfocitos)	-	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS
<u>Familia de gp140</u>						
IL-3 (mieloides)	-	-	+	-	5	GAS(IRF1>IFP>>Ly6)
IL-5 (mieloides)	-	-	+	-	5	GAS
GM-CSF (mieloide)	-	-	+	-	5	GAS
<u>Familia de la hormona del crecimiento</u>						
GH	?	-	+	-	5	
PRL	?	+/-	+	-	1,3,5	
EPO	?	-	+	-	5	GAS (B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
<u>Tirosina quinazas receptoras</u>						
EGF	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS(no IRF1)

5 Para construir un elemento promotor que contenga GAS, que se usa en los ensayos biológicos descritos en los ejemplos 78-80, se usa una estrategia basada en PCR para generar una secuencia promotora de GAS+SV40. El cebador en 5' contiene cuatro copias en tándem del sitio de unión GAS hallado en el promotor IRF1 y demostrado anteriormente que se une a las STAT tras la inducción con una serie de citocinas (Rothman et al., Immunity 1:457468 (1994).), aunque se pueden usar en su lugar otros elementos GAS o ISRE. El cebador en 5' también contiene 18 pb de secuencia complementaria a la secuencia del promotor temprano de SV40 y está flanqueado por un sitio XhoI. La secuencia del cebador en 5' es:

10 **5':GCGCCTCGAGATTTCCCGAAATCTAGATTTCCCGAAATGATTTCCCGAAA  
TGATTTCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAG:3' (SEC ID N° 1114)**

El cebador cadena abajo es complementario al promotor de SV40 y está flanqueado por un sitio Hind III: 5':GCGGCAACCTTTTTGCAAAGCCTAGGC:3' (SEC ID N° 1115)

15 La amplificación por PCR se realiza usando el molde del promotor SV40 presente en plásmido B-gal:promotor obtenido en Clontech. El fragmento de PCR resultante se digiere con XhoI/Hind III y se subclona en BLSK2-. (Stratagene.) La secuenciación con cebadores directos e indirectos confirma que el inserto contiene la secuencia siguiente:

**S':CTCGAGATTTC~~CCCGAAATCTAGATTTC~~CCCGAAATGATTTC~~CCCGAAATGATT~~  
 TCCCGAAATATCTGOCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACT  
 CCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCT  
 GACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTC  
 CAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT:3'**

(SEC ID N° 1116)

Con este elemento promotor GAS unido al promotor de SV40, después se somete a ingeniería la construcción indicadora GAS:SEAP2. Aquí, la molécula indicadora es una fosfatasa alcalina secretada o "SEAP." No obstante, está claro que se puede usar cualquier molécula indicadora en lugar de SEAP, en este o en cualquiera de los otros ejemplos. Las moléculas indicadoras bien conocidas que se pueden usar en lugar de SEAP incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, fosfatasa alcalina, B-galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), o cualquier proteína detectable mediante un anticuerpo.

La secuencia anterior confirmó que el elemento promotor GAS-SV40 sintético se subclona en el vector pSEAP-Promotor obtenido de Clontech usando HindIII y XhoI, sustituyendo con eficacia el promotor de SV40 con el elemento promotor amplificado GAS:SV40 para crear el vector GAS-SEAP. No obstante, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina y por tanto, no se prefiere para los sistemas de expresión en mamíferos.

Por tanto, con el fin de generar líneas celulares estables de mamíferos que expresan el indicador GAS-SEAP, se retira el casete GAS-SEAP del vector GAS-SEAP usando Sall y NotI y se inserta en un vector de estructura que contiene el gen de resistencia a neomicina, tal como pGFP-1 (Clontech), usando estos sitios de restricción en el sitio de clonación múltiple para crear el vector GAS-SEAP/Neo. Una vez que este vector se transfecta en células de mamífero, este vector se puede usar después como molécula indicadora para la unión de GAS como se describe en los ejemplos 78-80.

Se pueden realizar otras construcciones usando la descripción anterior y sustituyendo GAS con una secuencia promotora diferente. Por ejemplo, la construcción de moléculas indicadoras que contienen las secuencias promotoras EGR y NF-KB se describen en los ejemplos 78-82. No obstante, muchos otros promotores se pueden sustituir usando los protocolos descritos en estos ejemplos. Por ejemplo, los promotores SRE, IL-2, NFAT u osteocalcina se pueden sustituir, solos o en combinación (p. ej., GAS/NF-KB/EGR, GAS/NF-KB, IL-2/NFAT o NF-KB/GAS). De un modo similar, se pueden usar otras líneas celulares para analizar la actividad de la construcción indicadora, tal como HELA (epiteliales), HUVEC (endoteliales), Reh (células B), Saos-2 (osteoblastos), HUVAC (aórticas) o cardiomiocitos.

#### **Ejemplo 36: Ensayo de actividad de SEAP.**

Como molécula indicadora de los ensayos descritos en los ejemplos divulgados en el presente documento, se analiza la actividad de SEAP usando el kit Tropix Phospho-light (cat. BP-400) de acuerdo con el siguiente procedimiento general. El kit Tropix Phospho-light suministra la dilución, el ensayo y los tampones de reacción que se usan más adelante.

Ceban un dispensador con 2,5 x del tampón de dilución y dispensar 15 ul de 2,5x del tampón de dilución en Optiplates que contienen 35 ul de una solución que contiene una proteína de fusión de albúmina de la invención. Sellar las placas con un sellador de plástico e incubar a 65 °C durante 30 minutos. Separar las Optiplates para evitar un calentamiento no uniforme.

Enfriar las muestras hasta la temperatura ambiente durante 15 minutos. Vaciar el dispensador y ceban con el tampón de ensayo. Añadir 50 ml de tampón de ensayo e incubar a temperatura ambiente 5 minutos. Vaciar el dispensador y ceban con el tampón de reacción (ver la tabla más adelante). Añadir 50 ul de tampón de reacción e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Dado que la intensidad de la señal quimioluminiscente depende del tiempo y se requieren aproximadamente 10 minutos para leer 5 placas en un luminómetro, se deben tratar 5 placas cada vez y comenzar con el segundo grupo 10 minutos después.

Leer las unidades relativas de luz en el luminómetro. Establecer H12 como blanco e imprimir los resultados. Un incremento de la quimioluminiscencia indica actividad indicadora.

Tabla 6

N.º de placas	Diluyente tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)	N.º de placas	Diluyente tampón Rxn (ml)	CSPD (ml)
10	60	3	31	165	8,25
11	65	3,25	32	170	8,5
12	70	3,5	33	175	8,75
13	75	3,75	34	180	9
14	80	4	35	185	9,25
15	85	4,25	36	190	9,5
16	90	4,5	37	195	9,75
17	95	4,75	38	200	10
18	100	5	39	205	10,25
19	105	5,25	40	210	10,5
20	110	5,5	41	215	10,75
21	115	5,75	42	220	11
22	120	6	43	225	11,25
23	125	6,25	44	230	11,5
24	130	6,5	45	235	11,75
25	135	6,75	46	240	12
26	140	7	47	245	12,25
27	145	7,25	48	250	12,5
28	150	7,5	49	255	12,75
29	155	7,75	50	260	13
30	160	8			

**Ejemplo 37: Ensayo de indentificación de la actividad neuronal.**

5 Cuando las células se diferencian y proliferan se activa un grupo de genes mediante muchas vías de transducción de señal diferentes. Uno de estos genes, EGR1 (gen 1 de respuesta temprana de crecimiento), se induce en varios tejidos y tipos celulares tras la activación. El promotor de EGR1 es responsable de esta inducción. Usando el promotor de EGR1 unido a las moléculas indicadoras se puede evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de la invención para activar células.

10 En concreto, se usa el protocolo siguiente para evaluar la actividad neuronal en las líneas celulares PC12. Se sabe que las células PC12 (células de feocromocitoma de rata) proliferan y/o se diferencian mediante la activación con una serie de mitógenos, tales como TPA (acetato de tetradecanoil forbol), NGF (factor de crecimiento neural) y EGF (factor de crecimiento epidérmico). La expresión del gen EGR1 se activa durante este tratamiento. Por tanto,

mediante a transfección estable de las células PC12 con una construcción que contiene un promotor de EGR unido a indicador SEAP se puede evaluar la activación de las células PC12 mediante una proteína de fusión de albúmina de la presente invención.

- 5 La construcción indicadora EGR/SEAP se puede ensamblar mediante el protocolo siguiente. La secuencia promotora de EGR-1 (-633 a +1)(Sakamoto K et al., Oncogene 6:867871 (1991)) se puede amplificar por PCR a partir del ADN genómico humano usando los cebadores siguientes:

Primer cebador: 5' GCGCTCGAGGGATGACAGCOATAGAACCCCGG-3' (SEC ID N° 1117)

Segundo cebador: 5' GCGAAGCTTCGCGACTCCCCGGATCCGCCTC-3' (SEC ID N° 1118)

- 10 Usando el vector GAS:SEAP/Neo producido en el ejemplo 75, el producto amplificado de EGR1 se puede insertar en este vector. Linealizar el vector GAS:SEAP/Neo usando las enzimas de restricción XhoI/HindIII, eliminando el GAS/SV40. Restringir el producto amplificado de EGR1 con estas mismas enzimas. Ligar el vector y el promotor de EGR1.

- 15 Para preparar placas de 96 pocillos para cultivo celular, se añaden dos ml de una solución de revestimiento (dilución 1:30 de colágeno de tpo I (Upstate Biotech Inc. N° de Cat. 08115) en etanol al 30 % (esterilizada por filtración)) por una placa de 10 cm o 50 ml por pocillo de la placa de 96 pocillos y se deja secar al aire durante 2 horas.

- 20 Las células PC12 se cultivan de forma rutinaria en medio RPMI-1640 (Bio Whittaker) que contiene 105 de suero de caballo (JRH BIOSCIENCIAS, n° de Cat. 12449-78P), 5 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin en una placa de cultivo tisular de 10 cm revestida previamente. Cada tres-cuatro días se realizan de una a cuatro divisiones. Se extrane las células de las placas mediante raspado y se resuspenden con pipeteo arriba y abajo más de 15 veces.

Transfectar la construcción EGR/SEAP/Neo en PC12 usando técnicas concoidas en la técnica. Las células estables EGR-SEAP/PC12 se obtienen cultivando las células en 300 ug/ml de G418. El medio sin G418 se usa para crecimiento de rutina pero cada de uno a dos meses las células se volverán a cultivar en 300 ug/ml de G418 un par de pases.

- 25 Para evaluar la actividad neuronal se realiza una detección de una placa de cm cn células de una cnfluencia de aproximadamente 70 a 80 % eliminando el medio antiguo. Lavar las células una vez con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Después, dejar sin alimento a las células en medio con poco suero (RPMI-1640 que contiene 1 % de suero de caballo y 0,5 % de FBS con antibióticos) durante la noche.

- 30 A la mañana siguiente, retirar el medio y lavar las células con PBS. Raspar las células de la placa, suspender las células bien en 2 ml de medio con poco suero. Contar el número de células y añadir más medio con poco suero para alcanzar una densidad celular final de  $5 \times 10^5$  células/ml.

- 35 Añadir a cada pocillo de la placa de 96 pocillos 200 ul de la suspensión celular (equivalente a  $1 \times 10^5$  células/pocillo). Añadir una serie de concentraciones diferentes de una proteína de fusión de albúmina de la invención a 37 °C durante de 48 a 72 horas. Como control positivo se puede usar un factor de crecimiento que se sabe que activa las células PC12 a través del EGR, tal como 50 ng/ul del factor de crecimiento neuronal (NGF). Normalmente, en los pocillos control positivo se ve una multiplicación por cincuenta de la inducción de SEAP. El ensayo de SEAP se puede realizar rutinariamente usando técnicas conocidas en la técnica y/o como se describe en el ejemplo 76.

### **Ejemplo 38: Ensayo de la actividad de los linfocitos T.**

- 40 El siguiente protocolo se usa para evaluar la actividad de los linfocitos T identificando factores y determinando si una proteína de fusión de albúmina de la invención prolifera y/o se diferencia en células T. La actividad de las células T se evalúa usando la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el Ejemplo 35. Por tanto, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad para activar la vía de transducción de señal Jaks-STATS. Las células T usadas en este ensayo son células T Jurkat (n° de acceso en la ATCC TIB-152), aunque también se pueden usar las células Molt-3 (n° de acceso en la ATCC CRL-1552) y las células Molt-4 (n° de acceso en la ATCC CRL-1582).

- 45 Las células T Jurkat son células colaboradoras Th1 CD4+ linfoblásticas. Con el fin de generar líneas celulares estables, aproximadamente 2 millones de células Jurkat se transfectan con el vector GAS-SEAP/neo usando DMRIE-C (Life Technologies) (procedimiento de transfección descrito más adelante). Las células transfectadas se siembran hasta una densidad de aproximadamente 20.000 células por pocillo y se seleccionan los transfectantes resistentes a 1 mg/ml de denticina. Las colonias resistentes se expanden y después se analiza su respuesta a 50 concentraciones crecientes de interferón gamma. Se demuestra la respuesta a la dosis de un clon seleccionado.

Específicamente, el protocolo siguiente dará suficientes células para 75 pocillos que contienen 200 ul de células. Por tanto, se escala o se realiza varias veces para generar suficientes células para múltiples placas de 96 pocillos. Las células Jurkat se mantienen en medio RPMI + 10 % de suero con 1 % de Pen-Strep. Combinar 2,5 ml de OPTI-MEM (Life Technologies) con 10 µg de ADN plasmídico en un matraz T25. Añadir 2,5 ml de OPTI-MEM que contiene

50 ul de DMRIE-C e incubar a temperatura ambiente durante 15 - 45 minutos.

Durante el periodo de incubación, contar la concentración celular, centrifugar el número requerido de células ( $10^7$  por transfección) y resuspender en OPTI-MEM hasta una concentración final de  $10^7$  células/ml. Después, añadir 1 ml de  $1 \times 10^7$  células en OPTI-MEM a un matraz T25 e incubar a 37 °C durante 6 horas. Después de la incubación, añadir 10 ml de RPMI + 15 % de suero.

Las líneas indicadoras estables Jurkat:GAS-SEAP se mantienen en medio RPMI + 10 % de suero, 1 mg/ml de denticina y 1 % de Pen-Strep. Estas células se tratan con concentraciones variables de una o más proteínas de fusión de la presente invención.

El día del tratamiento con la proteína de fusión, se deberán lavar las células y resuspender en RPMI + 10 % de suero recién preparado hasta una densidad de 500.000 células por ml. El número exacto de células necesarias dependerá del número de proteínas de fusión y el número de concentraciones diferentes de las proteínas de fusión que se van a someter a detección selectiva. Para una placa de 96 pocillos se necesitan aproximadamente 10 millones de células (para 10 placas, 100 millones de células).

Las placas de pocillos que contienen células Jurkat tratadas con la proteína de fusión se introducen en un incubador durante 48 horas (nota: este tiempo es variable entre 48 y 72 horas). Muestras de 35 ul de cada pocillo se transfieren después a una placa opaca de 96 pocillos usando una pipeta de 12 canales. Las placas opacas se cubrirán (usando cubiertas de celofán) y se almacenarán a -20 °C hasta que se realizan los ensayos de SEAP de acuerdo con el ejemplo 76. Las placas que contienen las células tratadas restantes se introducen a 4 °C y sirven como fuente de material para repetir el ensayo en un pocillo específico si se desea.

Como control positivo, se pueden usar 100 unidades/ml de interferón gamma que se sabe que activan las células Jurkat T. Normalmente, en los pocillos control positivo se ve una multiplicación por 30.

El protocolo anterior se puede usar en la generación de células transfectadas tanto de forma transitoria como estable, lo que será evidente para los expertos en la técnica.

**Ejemplo 39: Ensayo de la actividad de las células T.**

NF-KB (el factor nuclear KB) es un factor de transcripción activado por una amplia variedad de agentes, incluidas las citoquinas inflamatorias IL-1 y TNF, CD30 y CD40, la linfotoxina alfa y la linfotoxina beta, mediante exposición a LPS o trombina y mediante la expresión de ciertos productos génicos virales. Como factor de transcripción, el NF-KB regula la expresión de los genes implicados en la activación de las células inmunitarias, el control de la apoptosis (NF- KB parece proteger a las células de la apoptosis), el desarrollo de células B y T, las respuestas antivirales y antimicrobianas y múltiples respuestas al estrés.

En condiciones sin estimulación, el NF- KB se retiene en el citoplasma con I-KB (Inhibidor KB). No obstante, tras la estimulación, el I- KB se fosforila y se degrada, haciendo que el NF- KB pase al núcleo y de este modo, se activa la transcripción de los genes diana. Los genes diana activados por NF- KB incluyen los de IL-2, IL-6, GM-CSF, ICAM-1 y el MHC de clase 1.

Debido a su papel central y la capacidad para responder a una serie de estímulos, las construcciones indicadoras que usan el elemento promotor de NF-KB se usan para seleccionar la proteína de fusión. Los activadores o inhibidores de NF-KB serían útiles en el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, los inhibidores de NF-KB se podrían usar para tratar las enfermedades relacionadas con la activación aguda o crónica de NF-KB, tal como la artritis reumatoide.

Para construir un vector que contiene el elemento promotor de NF-KB se usa una estrategia basada en PCR. El cebador cadena arriba contiene cuatro copias en tándem del sitio de unión de NF-KB (GGGGACTTTCCC) (SEC ID N° 119), 18 pb de secuencia complementaria al extremo 5' de la secuencia del promotor temprano de SV40 está flanqueado por un sitio XhoI.

**5':GCGGCCTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTC  
CATCCTGCCATCTCAATTAG:3' (SE ID N° 1120)**

El cebador cadena abajo es complementario al extremo 3' del promotor de SV40 y está flanqueado por un sitio Hind III:

5':GCGGCAAGCTTTTGCAAAGCCTAGGC:3' (SEC ID N° 1115)

La amplificación por PCR se realiza usando el molde del promotor SV40 presente en pB-gal:promotor obtenido en Clontech. El fragmento de PCR resultante se digiere con XhoI y Hind III y se subclona en BLSK2-. (Stratagene) La secuenciación con cebadores directos e indirectos confirma que el inserto contiene la secuencia siguiente:

50

5':CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCCATCTG  
 CCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC  
 CTA ACTCCGCCCAGTTCCGCCCA TTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTAT  
 TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG  
 AGGCTTTTTTGGAGGCC TAGGCTTTTGCAAAAAGCTT:3' (SEC ID N° 1121)

Después, sustituir el elemento del promotor mínimo de SV40 presente en el plásmido pSEAP2-promotor (Clontech) con este fragmento de NF-KB/SV40 usando XhoI y HindIII. No obstante, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina y por tanto, no se prefiere para los sistemas de expresión en mamíferos.

- 5 Con el fin de generar líneas celulares de mamífero estables, se extrae el casete NF-KB/SV40/SEAP del vector NF-KB/SEAP anterior usando las enzimas de restricción Sall y NotI y se inserta en un vector que contiene resistencia a neomicina. Particularmente, el casete NF-KB/SV40/SEAP se insertó en pGFP-1 (Clontech), sustituyendo el gen de GFP, restringiendo después el pGFP-1 con Sall y NotI.

- 10 Una vez creado el vector NF-KB/SV40/SEAP/Neo, se crean células T Jurkat estables y se mantienen de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 76. De un modo similar, el procedimiento para analizar las proteínas de fusión con estas células T Jurkat estables también se describe en el ejemplo 76. Como control positivo, a los pocillos H9, H10 y H11 se añade TNF-alfa exógeno (0,1, 1, 10 ng) y normalmente se observa una multiplicación de 510 de la activación.

#### Ejemplo 40: Ensayo de indentificación de la actividad mieloide.

- 15 El siguiente protocolo se usa para evaluar la actividad mieloide de una proteína de fusión de albúmina de la invención determinando si la proteína de fusión prolifera y/o se diferencia en células mieloides. La actividad de las células mieloides se evalúa usando la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el Ejemplo 75. Por tanto, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad para activar la vía de transducción de señal Jaks-STATS. La célula mieloide usada en este ensayo es U937, una línea celular pre-monocito, aunque se puede usar TF-1, HL60 o KG1.

- 20 Para transfectar las células U937 de forma transitoria con la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el ejemplo 75 se usa un procedimiento DEAE-Dextrano (Kharbanda et. al., 1994, Cell Growth & Differentiation, 5:259265). Primero, recolectar  $2 \times 10^7$  células U937 y lavar con PBS. Las células U937 normalmente se cultivan en medio RPMI 1640 que contiene 10 % de suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor suplementado con 100 unidades/ml de penicilina y 10mg/ml de estreptomina.

- 25 Después, suspender las células en 1 ml de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) que contiene 0,5 mg/ml de DEAE-Dextrano, 8 µg de ADN del plásmido GAS-SEAP2, NaCl 140 mM, KCl 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  375 µM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y  $\text{CaCl}_2$  675 µM. Incubar a 37 °C durante 45 minutos.

- 30 Lavar las células con medio RPMI 1640 que contiene 10 % de FBS y después, resuspender en 10 ml de medio completo e incubar a 37 °C durante 36 horas.

- Las células estables GAS-SEAP/U937 se obtienen cultivando las células en 400 µg/ml de G418. El medio sin G418 se usa para crecimiento de rutina pero cada de uno a dos meses las células se volverán a cultivar en 400 µg/ml de G418 un par de pases.

- 35 Estas células se analizan mediante recolección de  $1 \times 10^8$  células (esto es bastante para un ensayo de diez placas de 9 pocillos) y lavar con PBS. Suspender las células en 200 ml del medio de crecimiento descrito anteriormente, con una densidad final de  $5 \times 10^5$  células/ml. Sembrar en placas 200 µl de células por pocillo en la placa de 96 pocillos (o  $1 \times 10^5$  células/pocillo).

- 40 Añadir diferentes concentraciones de la proteína de fusión. Incubar a 37 °C durante de 48 a 72 horas. Como control positivo, se pueden usar 100 unidades/ml de interferón gamma que se sabe que activan las células U937. Normalmente, en los pocillos control positivo se ve una multiplicación por 30. Se realiza el ensayo de SEAP del sobrenadante de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y/o el protocolo descrito en el ejemplo 76.

#### Ejemplo 41: Ensayo de identificación de cambios en la concentración de moléculas pequeñas y la permeabilidad de la membrana.

Se sabe que la unión de un ligando a un receptor altera los niveles intracelulares de las moléculas pequeñas, tales



como calcio, potasio, sodio y el pH, así como el potencial de membrana. Estas alteraciones se pueden medir en un ensayo para identificar las proteínas de fusión que se unen a los receptores de una célula concreta. Aunque el siguiente protocolo describe un ensayo para el calcio, este protocolo se puede modificar fácilmente para detectar los cambios en el potasio, el sodio, el pH, el potencial de membrana, o cualquier otra molécula pequeña que se pueda detectar mediante una sonda fluorescente.

El ensayo siguiente usa el lector de placas Fluorometric Imaging Plate Reader ("FLIPR") para medir los cambios en las moléculas fluorescentes (Molecular Probes) que se unen a las moléculas pequeñas. Claramente, se puede usar cualquier molécula fluorescente que detecta una molécula pequeña en lugar de la molécula de calcio fluorescente, fluo-4 (Molecular Probes, Inc.; n° de catálogo F-14202), usada en el presente documento.

Para las células adherentes, sembrar las células a 10.000-20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos negra Co-star con fondo transparente. La placa se incuba en un incubador de CO<sub>2</sub> incubator durante 20 horas. Las células adherentes se lavan dos veces en un lavador Biotek con 200 ul de HBSS (solución salina equilibrada de Hank) que deja 100 ul de tampón después del lavado final.

Se prepara una solución madre de 1 mg/ml fluo-4 en 10 % de ácido plurónico DMSO. Para cargar las células con fluo-4, a cada pocillo se añaden 50 ul de 12 ug/ml de fluo-4. La placa se incuba a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 60 minutos. La placa se lava cuatro veces en el lavador Biotek con HBSS dejando 100 ul de tampón.

Para células ni adherentes, las células se centrifugan desde el medio de cultivo. Las células se resuspenden a 2-5x10<sup>6</sup> células/ml con HBSS en un tubo cónico de 50 ml. A cada ml de suspensión celular se añaden 4 ul de una solución de 1 mg/ml fluo-4 en 10 % de ácido plurónico DMSO. Después, el tubo se introduce en un baño de agua a 37 °C durante 3060 minutos. Las células se lavan dos veces con HBSS, se resuspenden hasta 1x10<sup>6</sup> células/ml y se dispensan en una microplada a 100 ul/pocillo. La placa se centrifuga a 1.000 rpm durante 5 minutos. Después, la placa se lava una vez en Denley Cell Wash con 200 ul, seguido de una etapa de aspiración hasta un volumen final de 100 ul.

Para un ensayo no basado en células, cada pocillo contiene una molécula fluorescente, tal como fluo-4. La proteína de fusión de la invención se añade al pocillo y se detecta un cambio en la fluorescencia.

Para medir la fluorescencia del calcio intracelular, el FLIPR se fija para los parámetros siguientes: (1) la ganancia del sistema es de 300-800 mW; (2) el tiempo de exposición es de 0,4 segundos; (3) Cámara F/fin es F/2; (4) la excitación es de 488 nm; (5) la emisión es 530 nm; y (6) la adición de muestra es 50 µl. La emisión incrementada a 530 nm indica un acontecimiento de señalización extracelular causado por una proteína de fusión de albúmina de la presente invención o una molécula inducida por una proteína de fusión de albúmina de la presente invención, que ha dado como resultado un incremento de la concentración de Ca<sup>++</sup> intracelular.

#### **Ejemplo 42: Ensayo de identificación de la actividad tirosina quinasa**

Las proteínas tirosina quinasas (PTK) representan un grupo diverso de quinasas transmembranales y citoplásmicas. Dentro del grupo de las proteínas tirosina quinasas receptoras (RPTK) están los receptores de una serie de factores de crecimiento mitogénicos y metabólicos, incluidas las subfamilias de receptores de PDGF, FGF, EGF, NGF, HGF e insulina. Además existe una gran familia de RPTK para las que se desconoce el correspondiente ligando. Los ligandos de los RPTK incluyen principalmente, proteínas pequeñas secretadas, pero también proteínas unidas a la membrana y de la matriz extracelular,

La activación de los RPTK por los ligandos implica dimerización de receptor mediada por ligandos, que tiene como resultado la transfosforilación de las subunidades del receptor y la activación de las tirosina quinasas citoplásmicas. Las tirosina quinasas citoplásmicas incluyen tirosina quinasas asociadas a receptores de la familia src (p. ej., src, yes, lck, lyn, fyn) y proteínas tirosina quinasas no unidas a receptores y citosólicas, tales como la familia Jak, cuyos miembros participan en la transducción de señal desencadenada por la superfamilia de receptores de citocinas (p. ej., las interleucinas, los interferones, GM-CSF y leptina).

Dado el amplio abanico de factores conocidos capaces de estimular la actividad de tirosina quinasa, la identificación de si una proteína de fusión de albúmina de la presente invención o una molécula inducida por una proteína de fusión de la presente invención es capaz de activar las vías de transducción de la señal de la tirosina quinasa es de interés. Por tanto, el siguiente protocolo está diseñado para identificar dichas moléculas capaces de activar las vías de transducción de la señal de la tirosina quinasa.

Sembrar las células diana (p. ej., queratinocitos primarios) a una densidad de aproximadamente 25.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos Loprodyne Silent Screen Plates adquirida en Nalge Nunc (Naperville, IL). Las placas se esterilizan con dos aclarados de 30 minutos con etanol al 100 %, aclaradas con agua y secadas durante la noche. Algunas placas se revisten durante 2 horas con 100 ml de cultivo celular de colágeno de tipo 1 (50 mg/ml), gelatina (2 %) o polilisina (50 mg/ml), todos los cuales se pueden adquirir en Sigma Chemicals (St. Louis, MO) o de Matrigel al 10 % adquirida de Becton Dickinson (Bedford, MA), o suero de ternero, se aclaran con PBS y se almacenan a 4 °C. El cultivo celular en estas placas se analiza sembrando 5.000 células/pocillo en medio de crecimiento y cuantificación indirecta del número de células mediante el uso de alamar Blue como ha descrito el

fabricante Alamar Biosciences, Inc. (Sacramento, CA) después de 48 horas. Se usan cubiertas de placa Falcon n.º: 3071 de Becton Dickinson (Bedford, MA) para cubrir las placas Loprodyne Silent Screen Plates. También se pueden usar placas de cultivo celular Falcon Microtest III en algunos experimentos de proliferación.

5 Para preparar extractos, se siembran células A431 sobre las membranas de nailon de placas Loprodyne (20.000/200 ml/pocillo) y se cultivan durante la noche en medio completo. Las células se inactivan mediante incubación en medio basal sin suero durante 24 horas. Tras 5 - 20 minutos, el tratamiento con EGF (60 ng/ml) o concentraciones diferentes de una proteína de fusión de albúmina de la invención, se extrajo el medio y a cada pocillo se añaden 100 ml del tampón de extracción ((HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 1 %, SDS al 0,1 %, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2 mM y un cóctel de inhibidores de la proteasa (n.º: 1836170) obtenidos de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN)) y la placa se agita en un agitador rotatorio durante 5 minutos a 4 °C. Después, la placa se coloca en un colector de transferencia de vacío y el extracto se filtra a través de los fondos de membrana de 0,45 mm de cada pocillo usando vacío doméstico. Los extractos se recogen en una placa de captura/ensayo de 96 pocillos en el fondo del colector de vacío e inmediatamente se introducen en hielo. Para obtener extractos aclarados mediante centrifugación, el contenido de cada pocillo después de solubilizar con detergente durante 5 minutos, se retira y se centrifuga durante 15 minutos a 4 °C a 160.000 x g.

Se analizan los extractos filtrados para determinar los niveles de actividad tirosina quinasa. Aunque se conocen muchos procedimientos de detección de la actividad tirosina quinasa, en el presente documento se describe un procedimiento.

20 En general, la actividad tirosina quinasa de una proteína de fusión de albúmina de la invención se evalúa determinando su capacidad para fosforilar un residuo de tirosina sobre un sustrato específico (un péptido biotinilado). Los péptidos biotinilados que se pueden usar para este fin incluyen PSK1 (correspondiente a los aminoácidos 6 - 20 de la división celular quinasa cdc2-p34) y PSK2 (correspondiente a los aminoácidos 1 - 17 de gastrina). Ambos péptidos son sustratos de una serie de tirosina quinasa y están disponibles en Boehringer Mannheim.

25 La reacción de tirosina quinasa se establece añadiendo los siguientes componentes en orden. Primero, añadir 10 ul de péptido biotinilado 5 uM, después 10 ul de ATP/Mg<sub>2+</sub> (ATP 5 mM / MgCl<sub>2</sub> 50 mM), después 10 ul de 5x de tampón de ensayo (imidazol clorhidrato 40 mM, pH 7,3, beta-glicerofosfato 40 mM, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 100mM, MaCl<sub>2</sub> 5 mM, 0,5 mg/ml de BSA), después 5 ul de vanadato sódico (1 mM) y después 5 ul de agua. Mezclar los componentes suavemente y preincubar la mezcla de reacción a 30 °C durante 2 minutos. Iniciar la reacción añadiendo 10 ul de la enzima control o el sobrenadante filtrado.

La reacción del ensayo de tirosina quinasa se termina después añadiendo 10 ul de EDTA 120 nM e introducir las reacciones en hielo.

35 La actividad tirosina quinasa se determina transfiriendo una alícuota de 50 ul de la mezcla de reacción \*\*\*a una placa de microtitulación (MTP) e incubando a 37 °C durante 20 minutos. Esto permite revestir con estreptavidina la placa de 96 pocillos para asociar con el péptido biotinilado. Lavar el módulo MTP con 300 ul/pocillo de PBS cuatro veces. Después añadir a cada pocillo 75 ul de anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con peroxidada de rábano picante (anti-P-Tyr-POD (0,5 u/ml)) e incubar a 37 °C durante una hora. Lavar el pocillo como se ha indicado con anterioridad.

40 Después, añadir 100 ul de la solución de sustrato de peroxidada (Boehringer Mannheim) e incubar a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos (hasta 30 minutos). Medir la absorbancia de la muestra a 405 nm usando un lector de ELISA. El nivel de actividad de peroxidada unida se cuantifica usando un lector de ELISA y refleja el nivel de actividad tirosina.

#### **Ejemplo 43: Ensayo de indentificación de la actividad de fosforilación.**

45 Como una alternativa potencial y / o complementaria del ensayo de la actividad de la proteína tirosina quinasa descrita en el Ejemplo 82 también se puede usar un ensayo que detecta la activación (fosforilación) de las principales intermedios de transducción de señal intracelular. Por ejemplo, como se describe a continuación, un ensayo particular puede detectar la fosforilación de tirosina de las Erk-1 y Erk-2 quinasa. Sin embargo, la fosforilación de otras moléculas, tales como Raf, JNK, p38 MAP, MAP quinasa quinasa (MEK), MEK quinasa, Src, quinasa específica de músculo (MnSK), IRAK, Tec y Janus, así como cualquier otra molécula de fosfoserina, fosfotirosina o fosfotreonina, puede detectarse mediante la sustitución de estas moléculas para Erk-1 o Erk-2 en el siguiente ensayo.

55 Específicamente, las placas de ensayo se hacen mediante revestimiento de una placa de ELISA de 96 pocillos con 0,1 ml de proteína G (1 ug / ml) durante 2 horas a temperatura ambiente, (RT). Las placas se enjuagaron con PBS y se bloquearon con 3 % de BSA / PBS durante 1 hora a RT. La proteína G placas se trataron entonces con 2 anticuerpos monoclonales comerciales (100 ng / pocillo) contra Erk-1 y Erk-2 (1 hora a TA) (Santa Cruz Biotechnology). (Para detectar otras moléculas, esta etapa puede modificarse fácilmente mediante la sustitución de un anticuerpo monoclonal de detección de cualquiera de las moléculas descritas anteriormente.) Después de 3-5 lavados con PBS, las placas se almacenan a 4 ° C hasta su uso

Se siembran células A431 a 20.000 / pocillo en una placa filtrante de 96 pocillos y se cultivan durante la noche en medio de crecimiento. Las células se mantienen sin alimento durante 48 horas en medio basal (DMEM) y después se tratan con EGF (6 ng / pocillo) o concentraciones variables de la proteína de fusión de la invención durante 5-20 minutos. Después, las células se solubilizan y se filtran los extractos directamente en la placa de ensayo.

- 5 Después de la incubación con el extracto durante 1 hora a TA, los pocillos se enjuagan de nuevo. Como control positivo se usa una preparación comercial de MAP quinasa (10 ng / pocillo) en lugar de extracto de A431. Las placas se tratan después con un anticuerpo policlonal comercial (de conejo) (1 ug / ml) que reconoce específicamente el epítipo fosforilado de las Erk-1 y Erk-2 quininas (1 hora a TA). Este anticuerpo se biotinila mediante procedimientos estándar. El anticuerpo policlonal unido se cuantifica a continuación mediante incubaciones sucesivas con reactivo de mejora de europio-estreptavidina y la fluorescencia del europio en el instrumento DELFIA de Wallac (fluorescencia resuelta en el tiempo). Un aumento de la señal fluorescente sobre el fondo indica una fosforilación por la proteína de fusión de la presente invención o una molécula inducida por una proteína de fusión de albúmina de la presente invención.

#### **Ejemplo 44: Ensayo para la estimulación de la proliferación de células CD34 + en médula ósea.**

- 15 Este ensayo se basa en la capacidad de los linfocitos CD34+ humanos para proliferar en presencia de factores de crecimiento hematopoyéticos y evalúa la capacidad de las proteínas de fusión de la invención para estimular la proliferación de células CD34 +.

Se ha mostrado previamente que la mayoría de los precursores maduras responderán a una única señal. Más precursores inmaduros requieren al menos dos señales para responder. Por lo tanto, para analizar el efecto de las proteínas de fusión de la invención sobre la actividad hematopoyética de una amplia gama de células progenitoras, el ensayo contiene una proteína de fusión dada de la invención en presencia o ausencia de factores de crecimiento hematopoyéticos. Las células aisladas se cultivan durante 5 días en presencia del factor de células madre (SCF) en combinación con la muestra analizada. El SCF solo tiene un efecto muy limitado sobre la proliferación de las células de la médula ósea (MO) y actúa en condiciones únicamente como factor de "supervivencia". Sin embargo, combinado con cualquier factor que exhiba un efecto estimulante sobre estas células (por ejemplo, EL-3), el SCF causará un efecto sinérgico. Por lo tanto, si la proteína de fusión analizada tiene un efecto estimulante sobre los progenitores hematopoyéticos, tal actividad puede detectarse fácilmente. Puesto que las células normales de la MO tienen un bajo nivel de células en ciclo, es probable que cualquier efecto inhibidor de una proteína de fusión dada podría no detectarse. En consecuencia, el ensayo de un efecto inhibidor sobre los progenitores se analiza, preferentemente, en células que se someten primero a estimulación *in vitro* con SCF + IL + 3 y después se pone en contacto con el compuesto que se está evaluando para determinar la inhibición de dicha proliferación inducida.

Brevemente, las células CD34 + se aíslan usando el procedimiento conocido de la técnica. Las células se descongelan y resuspenden en medio (medio 60 QBSF sin suero con 1 % de L-glutamina (500 ml) Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD nº de cat. 160-204-101). Después de varias etapas de centrifugación suave a 200 xg, las células se dejan reposar durante una hora. El recuento de células se ajusta a  $2,5 \times 10^5$  células / ml. Durante este tiempo, se añaden 100 µl de agua estéril a los pocillos periféricos de una placa de 96 pocillos. Las citocinas que se pueden analizar una proteína de fusión de albúmina de la invención en este ensayo son rhSCF (R & D Systems, Minneapolis, MN, Cat # 255-SC) a 50 ng / solas ml y en combinación con rhSCF y rhIL-3 (I + D Sistema, Minneapolis, MN, Cat # 203-ML) a 30 ng / ml. Después de una hora, se añaden a los medios 10 µl de citocinas preparadas, a concentraciones variables de una proteína de fusión de albúmina de la invención y 20 µl de células, que ya está presente en los pocillos para permitir un volumen total final de 100 µl. Las placas se colocan después en un incubador a 37 ° C / 5 % de CO<sub>2</sub> durante cinco días.

Dieciocho horas antes de la recolección del ensayo se añaden 0,5 µ Ci / pocillo de [3H] timidina a un volumen de 10 l a cada pocillo para determinar la tasa de proliferación. El experimento se termina mediante la recolección de las células de cada placa de 96 pocillos a una Filtermat usando el Tomtec Harvested 96. Después de la cosecha, las almohadillas de filtros se secan, se recortan y se colocan en los montajes OMNIFILTER que consisten en una placa OmniFilter y una bandeja OmniFilter. 60 µ del Microscint se añaden a cada pocillo y la placa de escala con TopScal-Una película de sellado de prensa en un código de barras se fija en la primera placa para el recuento. Las placas selladas se cargan después y el nivel de radiactividad se determina a través de la Packard Top Count y los datos impresos se recogieron para su análisis. El nivel de radioactividad refleja la cantidad de proliferación celular.

Los estudios descritos en este ejemplo analizan la actividad de una proteína de fusión dada para estimular la proliferación de células de médula ósea CD34 +. Un experto en la técnica podría modificar fácilmente los estudios ilustrativos para analizar la actividad de las proteínas de fusión y polinucleótidos de la invención (por ejemplo, terapia génica), así como agonistas y antagonistas de los mismos. La capacidad de una proteína de fusión de la albúmina de la invención para estimular la proliferación de células CD34+ de médula ósea células indica que la proteína de fusión de albúmina y / o polinucleótidos que corresponden a la proteína de fusión son útiles para el diagnóstico y tratamiento de trastornos que afectan el sistema inmune y la hematopoyesis. Usos representativos se describen en las secciones "Inmune Actividad" y "enfermedad infecciosa" anteriormente y en otras partes en el presente documento.

**Ejemplo 45: Ensayo de la respuesta potenciada de la matriz extracelular (EMECR).**

El objetivo del ensayo de la respuesta celular mejorada (EMECR) de la matriz extracelular es para evaluar la capacidad de las proteínas de fusión de la invención para actuar sobre las células madre hematopoyéticas en el contexto de la señal inducida por la matriz extracelular (MEC).

- 5 Las células responden a los factores reguladores en el contexto de la(s) señal(es) recibidas desde el microambiente circundante, por ejemplo, los fibroblastos y las células madre endoteliales y epiteliales no pueden replicarse en ausencia de señales desde la MEC. Las células madre hematopoyéticas pueden sufrir autorenovación en la médula ósea, pero no en el cultivo en suspensión *in vitro*. La capacidad de las células madre para sufrir autorenovación *in vitro* depende de su interacción con las células del estroma y la proteína fibronectina de la MEC (fn). La adhesión de las células a la fn está mediado por los receptores de integrina  $\alpha_5\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_1$ , expresados por las células madre hematopoyéticas humanas y de ratón. El o los factores que se integran con el entorno de la MEC y que son responsables de la estimulación de la autorenovación de las células madre todavía no se han identificado. El descubrimiento de estos factores debería ser de gran interés en las aplicaciones de terapia génica y trasplante de médula ósea.
- 10
- 15 Brevemente, placas de poliestireno que no son de cultivo tisular y de 96 pocillos se revisten con fragmentos de fn a una concentración de recubrimiento de  $0,2 \mu\text{g cm}^2$ . Las células de médula ósea de ratón se cultivan en placas (1000 células / pocillo) en 0,2 ml de medio libre de suero. Las células cultivadas en presencia de IL-3 (5 ng / ml) + SCF (50 ng / ml) servirían como el control positivo, las condiciones bajo las cuales cabe esperar que se produzca poca autorenovación por una pronunciada diferenciación de las células madre. Las proteínas de fusión de la albúmina de la invención se analizan con controles negativos apropiados en presencia y ausencia de SCF (5,0 ng / ml), donde el volumen de la composición administrada que contiene la proteína de fusión de albúmina de la invención representa el 10 % del volumen total del ensayo. Las células cultivadas en placas se dejan crecer incubando en un incubador de cultivo tisular con ambiente bajo en oxígeno (5 % de  $\text{CO}_2$ , 7 % de  $\text{O}_2$  y 88 % de  $\text{N}_2$ ) durante 7 días. El número de células en proliferación dentro de los pocillos se cuantifican después midiendo la incorporación de timidina en el ADN celular. La verificación de los valores positivos requerirá la caracterización fenotípica de las células, que puede realizar aumentando el sistema de cultivo y usando los reactivos de anticuerpos apropiados contra los antígenos de la superficie celular y exploración con FACS.
- 20
- 25

Si se descubre que una proteína de fusión particular de la presente invención es estimulante de los progenitores hematopoyéticos, la proteína de fusión y los polinucleótidos correspondientes a la proteína de fusión pueden ser útiles, por ejemplo, en el diagnóstico y tratamiento de trastornos que afectan el sistema inmunológico y la hematopoyesis. Usos representativos se describen en las secciones "Actividad inmunitaria" y "Enfermedad infecciosa" anteriormente y en otras partes en el presente documento. La forma de la proteína de fusión también ser útil en la expansión de las células madre y los progenitores comprometidos de diversas estirpes sanguíneas y en la diferenciación y / o proliferación de diversos tipos de células.

30

- 35 Además, las proteínas de fusión de albúmina de la invención y los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de albúmina de la invención, se pueden emplear también para inhibir la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y por lo tanto se pueden emplear para proteger a las células madre de la médula ósea de los agentes quimioterapéuticos durante la quimioterapia. Este efecto antiproliferativo puede permitir la administración de dosis mayores de agentes quimioterapéuticos y el tratamiento quimioterapéutico, por lo tanto, más eficaz.
- 40 Además, las proteínas de fusión de la invención y los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden ser útiles para el tratamiento y diagnóstico de trastornos hematopoyéticos relacionados tales como, anemia, pancitopenia, leucopenia, trombocitopenia o leucemia, ya que las células estromales son importantes en la producción de células de linajes hematopoyéticos. Los usos incluyen cultivo *ex vivo* de médula ósea, trasplante de médula ósea, reconstitución de médula ósea, radioterapia o quimioterapia de la neoplasia.
- 45

**Ejemplo 46: Proliferación de fibroblastos dérmicos humanos y de células de músculo liso aórtico.**

Una proteína de fusión de albúmina de la invención se añade a cultivos de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) y células de músculo liso aórtico humano (AoSMC) y se realizan dos co-ensayos con cada muestra. El primer ensayo examina el efecto de la proteína de fusión sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) o células de músculo liso aórtico humano (AoSMC). El crecimiento aberrante de fibroblastos o de células de músculo liso es parte de varios procesos patológicos, incluyendo fibrosis y reestenosis. El segundo ensayo examina la producción de IL-6 por NHDF y SMC. La producción de IL-6 es una indicación de la activación funcional. Las células activadas tendrán un incremento de la producción de una serie de citocinas y otros factores que puede tener como resultado un desenlace proinflamatorio o inmunomodulador. Los ensayos se realizan con y son estimulación con co-TNF $\alpha$  con el fin de comprobar la actividad coestimuladora o inhibidora.

50

55

Brevemente, el día 1, en las placas negras de 96 pocillos se introducen 1.000 células/pocillo (NHDF) o 2.000 células/pocillo (AoSMC) en 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo. El medio de cultivo para NHDF contiene: Medio basal Clonetics, 1mg/ml de hFGF, 5 mg/ml de insulina, 50 mg/ml de gentamicina, 2 % de FBS, mientras que el medio de

cultivo para AoSMC contiene medio basal Clonetics SM, 0,5 µg/ml de hEGF, 5 mg/ml de insulina, 1 µg/ml de hFGF, 50 mg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de anfotericina B, 5 % de FBS. Después de incubar a 37 °C durante al menos 45 horas se aspira el medio de cultivo y se reemplaza con medio para la detención del crecimiento. El medio para la detención del crecimiento para NHDF contiene medio basal para fibroblastos, 50 mg/ml de gentamicina, 2 % de FBS, mientras que el medio para la detención del crecimiento para AoSMC contiene medio basal SM, 50 mg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de anfotericina B, 0,4 % de FBS. Incubar a 37 °C hasta el día 2.

El día 2, se diseñan diluciones en serie y plantillas de una proteína de fusión de albúmina de la invención de un modo tal que siempre incluyen controles de medio y controles de proteína conocida. Para los experimentos de estimulación y de inhibición las proteínas se diluyen en medio de detención del crecimiento. Para los experimentos de inhibición se añade TNFα hasta una concentración final de 2 ng/ml (NHDF) o 5 ng/ml (AoSMC). Añadir 1/3 vol de controles que contienen medio o una proteína de fusión de albúmina de la invención e incubar a 37 °C/5 % de CO<sub>2</sub> hasta el día 5.

Transferir 60 µl de cada pocillo a otra placa de 96 pocillos marcada, cubrir con un sellador de placas y almacenar a 4 °C hasta el día 6 (para ELISA de IL6). A los 100 µl restantes en la placa de cultivo celular, añadir en asepsia Alamar Blue en una cantidad igual al 10 % del volumen de cultivo (10 µl). Devolver las placas al incubador durante de 3 a 4 horas. Después, medir la fluorescencia con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm usando el CytoFluor. Esto da los datos es estimulación/inhibición del crecimiento.

El día 5 se realiza el ELISA de IL6 revistiendo una placa de 96 pocillos con 50-100 ul/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-IL6 humano diluido en PBS a pH 7,4, se incuba a temperatura ambiente.

El día 6, vaciar las placas en la pila y se transfieren a toallitas de papel. Preparar el tampón de ensayo con PBS con 4 % de BSA. Bloquear las placas con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo de Pierce Super Block en PBS durante 12 h y después lavar las placas con tampón de lavador (PBS, 0,05 % de Tween-20). Transferir las placas a toallitas de papel. Después, añadir 50 µl/pocillo del anticuerpo monoclonal anti-IL6 humana marcado con biotina a 0,50 mg/ml. Realizar diluciones de la madre de IL-6 en medio (30, 10, 3, 1, 0,3, 0 ng/ml). Añadir muestras por duplicado a la fila superior de la placa. Cubrir las placas e incubar durante 2 horas a TA en el agitador.

Las placas se lavan con tampón de lavado y se transfieren a toallas de papel. Diluir estreptavidina marcada con EU a 1:1000 en tampón de ensayo y añadir 100 µl/pocillo. Cubrir la placa e incubar 1 hora a TA. Las placas se lavan de nuevo con tampón de lavado y se transfieren a toallas de papel.

Añadir 100 µl/pocillo de solución de potenciación. Agitar durante 5 minutos. Leer la placa en el Wallac DELFIA Fluometer. Las lecturas de muestras por triplicado en cada ensayo se tabularon y promediaron.

Un resultado positivo en este ensayo sugiere proliferación de células AoSMC y que la proteína de fusión de albúmina puede estar implicada en la proliferación de fibroblastos dérmicos y/o en la proliferación de células de músculo liso. Un resultado positivo también sugiere muchos usos potenciales de la proteína de fusión y los polinucleótidos que codifican la proteína de fusión de albúmina. Por ejemplo, la inflamación y las respuestas inmunitarias, la cicatrización de heridas y la angiogénesis tal como se detallan en la presente memoria. En particular, las proteínas de fusión se pueden usar en la cicatrización de heridas y la regeneración dérmica, así como la estimulación de la vasculogénesis, tanto de los vasos sanguíneos como de los linfáticos. El crecimiento de los vasos se puede usar en el tratamiento de por ejemplo, enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, las proteínas de fusión que muestran actividad antagonista en este ensayo pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones que implica angiogénesis actuando como agente anti-vascular (p. ej., antiangiogénesis). Estas enfermedades, trastornos y/o afecciones se conocen en la técnica y/o se describen en el presente documento, tales como, por ejemplo, neoplasias malignas, tumores sólidos, tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicas, neurofibromas, tracomas y granulomas piogénicos; placas arteroscleróticas; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, degeneración macular, rechazo de injertos corneales, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis, retinoblastoma, uveítis y Pterygia (crecimiento anormal de los vasos sanguíneos) del ojo, artritis reumatoide; psoriasis; retraso en la cicatrización de heridas; endometriosis; vasculogénesis; granulaciones; cicatrices hipertróficas (queloides); fracturas en zonas de no unión; esclerodermia; tracoma; adherencias vasculares; angiogénesis miocárdica; colaterales coronarias; colaterales cerebrales; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis de las extremidades isquémicas; síndrome de Osler-Webber; neovascularización en placas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; displasia fibromuscular; granulación de heridas; enfermedad de Crohn; y aterosclerosis. Además, las proteínas de fusión que actúan como antagonistas en este ensayo pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades antihiperproliferativas y/o antiinflamatorios conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

#### **Ejemplo 47: Expresión de la molécula de adhesión celular (CAM) en células endoteliales**

El reclutamiento de linfocitos en áreas de inflamación y angiogénesis implica interacciones ligando-receptor específicas entre las moléculas de adhesión a la superficie celular (CAM) sobre linfocitos y el endotelio vascular. El proceso de adhesión, en contextos normales y patológicos, sigue una cascada de múltiples etapas en la que participan la expresión de la molécula 1 de adhesión celular (ICAM-1), la molécula 1 de adhesión celular vascular

(VCAM-1) y la molécula 1 de adhesión leucocitaria endotelial (E-selectina) en células endoteliales (EC). La expresión de estas moléculas y de otras sobre el endotelio vascular determina la eficiencia con la que los leucocitos se pueden adherir a la vascularura local y extravasar al tejido local durante el desarrollo de una respuesta inflamatoria. La concentración local de citocinas y del factor de crecimiento participa en la modulación de la expresión de estas CAM.

Brevemente, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se cultivan en una placa estándar de 96 pocillos hasta confluencia, se retira el medio de crecimiento de las células y se sustituye con 100 µl de medio 199 (10 % de suero bovino fetal (FBS)). Las muestras para análisis (que contienen una proteína de fusión de la invención) y los controles positivos o negativos se añaden a la placa por triplicado (en volúmenes de 10 µl). Después, las placas se incuban a 37 °C durante 5 horas (expresión de selectina y de integrina) o 24 horas (solo expresión de integrina). Las placas se aspiran para eliminar el medio y a cada pocillo se añaden 100 µl de 0 - 1 % de paraformaldehído –OBS (con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>). Las placas se mantienen a 4 °C durante 30 minutos. La fijación se retira de los pocillos y los pocillos se lavan 1X con PBS(+Ca,Mg) + 0,5 % de BSA y se drenan. Se añaden 10 µl de anticuerpo primario diluido a los pocillos de ensayo y control. Se usan Anti-ICAM-1-Biotina, Anti-VCAM-1-Biotina y Anti-E-selectina-Biotina a una concentración de 10 µg/ml (dilución 1:10 de 0,1 mg/ml de anticuerpo madre). Las células se incuban a 37 °C durante 30 minutos en un ambiente humidificado. Los pocillos se lavan tres veces con PBS(+Ca,Mg) + 0,5 % de BSA. A cada pocillo se añaden 20 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida (dilución 1:5,00, en el presente documento denominada dilución de trabajo) y se incuban a 37 °C durante 30 minutos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS(+Ca,Mg) + 0,5 % de BSA. Disolver un comprimido de p-nitrofenol fosfato pNPP por 5 ml de tampón de glicina (pH 10,4). A cada pocillo de ensayo se añaden 100 µl de sustrato pNPP en tampón de glicina. Los pocillos estándar por triplicado se preparan a partir de la dilución de trabajo de estreptavidina-fosfatasa alcalina en tampón de glicina: 1:5.000 (10<sup>0</sup>) > 10<sup>-0.5</sup> > 10<sup>-1</sup> > 10<sup>-1.5</sup>. 5 µl de cada dilución se añaden a los pocillos por triplicado y el contenido en AP resultante es de 5,50 ng, 1,74 ng, 0,55 ng, 0,18 ng. Después, a cada uno de los pocillos convencionales se añaden 100 µl del reactivo pNPP. La placa se incuba a 37 °C durante 4 horas. A todos los pocillos se añade un volumen de 50 µl de NaOH 3M. La placa se lee en un lector de placas a 405 nm usando la opción de sustracción de fondo sobre pocillos blanco llenos con únicamente tampón de glicina. Adicionalmente, se establece la plantilla para indicar la concentración del conjugado-AP en cada pocillo estándar [5,50 ng; 1,74 ng; 0,55 ng; 0,18 ng]. Los resultados se indican como la cantidad de conjugado-AP unido en cada muestra.

#### **Ejemplo 48: Ensayo de proliferación de células endoteliales con Alamar Blue.**

Este ensayo se puede usar para determinar cuantitativamente la inhibición mediada por proteínas de la proliferación inducida por bFGF de células endoteliales linfáticas bovinas (LEC), células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) o células del miometrio uterino microvasculares humanas (UTMEC). Este ensayo incorpora un indicador de crecimiento fluorométrico basado en la detección de la actividad metabólica. Se prepara un ensayo de proliferación estándar Alamar Blue en EGM-2MV con 10 ng /ml de bFGF añadido como fuente de estimulación de las células endoteliales. Este ensayo se puede usar con varias células endoteliales con ligeros cambios en el medio de crecimiento y la concentración celular. Las diluciones de los lotes de proteínas a analizar se diluyen del modo adecuado. Se usa medio sin suero (GIBCO SFM) sin bFGF como control sin estimular y se incluyen angiostatina o TSP-1 como controles inhibidores conocidos.

Brevemente, se siembran LEC, BAEC o UTMEC en medio de crecimiento a una densidad de 5.000 a 2.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se colocan a 37 °C durante la noche. Después de incubar durante la noche las células, se extrae el medio de crecimiento y se sustituye con GIBCO EC-SFM. Las células se tratan con las diluciones adecuadas de una proteína de fusión de albúmina de la invención o muestra(s) de proteína control (preparadas en SFM) en pocillos por triplicado con bFGF adicional hasta una concentración de 10 ng/7ml. Una vez que las células se han tratado con las muestras, la o las placas se introducen de nuevo en el incubador a 37 °C durante tres días. Después de tres días, a cada pocillo se añaden 10 ml de la reserva de alamar blue (Biosource Cat# DAL1100) y la o las placas se introducen de nuevo en el incubador a 37 °C durante cuatro horas. Las placas se leen después con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm usando el lector de fluorescencia CytoFluor. Se registra la salida directa en unidades de fluorescencia relativas.

Alamar blue es un indicador de la oxidación-reducción que brilla y cambia de color en respuesta a la reducción química del medio de crecimiento a causa del crecimiento celular. A medida que las células crecen en el cultivo, la actividad metabólica innata tiene como resultado una reducción química del entorno inmediato circundante. La reducción relacionada con el crecimiento hace que el indicador cambie de forma oxidada (azul no fluorescente) a forma reducida (rojo fluorescente) (es decir, la proliferación estimulada producirá una señal más fuerte y la proliferación inhibida producirá una señal más débil y la señal total es proporcional al número total de células, así como a su actividad metabólica). El nivel de actividad de fondo se observa con medio sin nutrientes solo. Esto se compara con el resultado observado en las muestras control positivo (bFGF en medio de crecimiento) y las diluciones de las proteínas.

#### **Ejemplo 49: Detección de la inhibición de una reacción mixta de linfocitos**

Este ensayo se puede usar para detectar y evaluar la inhibición de una reacción mixta de linfocitos (RML) por las

proteínas de fusión de la invención. La inhibición de una RML puede deberse a un efecto directo sobre la proliferación y la viabilidad celular, la modulación de moléculas coestimuladoras sobre las células que interactúan, la modulación de la adhesividad entre linfocitos y células accesorias o la modulación de la producción de citocinas por las células accesorias. Las proteínas de fusión de albúmina pueden estar dirigidas a múltiples células e inhiben la RML, ya que la fracción de células mononucleares de sangre periférica en este ensayo incluye linfocitos T, B y asesinas naturales, así como monocitos y células dendríticas.

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención que se encontró que inhibían la RML pueden encontrar aplicación en enfermedades asociadas con la activación o proliferación de linfocitos y monocitos. Estas incluyen, entre otras, enfermedades tales como asma, artritis, diabetes, afecciones inflamatorias de la piel, psoriasis, eczema, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, arterioesclerosis, cirrosis, enfermedad del injerto contra el huésped, enfermedad del huésped contra el injerto, hepatitis, leucemia y linfoma.

Brevemente, los PBMC de donantes humanos se purifican mediante centrifugación en gradiente de densidad usando medio de separación de linfocitos (LSM<sup>®</sup>, Densidad de 1,0770 g / ml, Organon Teknika Corporation, West Chester, PA). Los PBMC de dos donantes se ajustan a  $2 \times 10^6$  células / ml en RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 10 % de FCS y glutamina 2 mM. Los PBMC de un tercer donante se ajustan a  $2 \times 10^5$  células / ml. A los pocillos de placas de microlitros de fondo redondo y 60 pocillos se añaden cincuenta microlitros de las PBMC de cada donante. Las diluciones del material de ensayo de la proteína de fusión (50  $\mu$ l) se añaden por triplicado a los pocillos de microlitro. Se añaden las muestras de ensayo (de la proteína de interés) para la dilución final de 1: 4; rhIL-2 (R & D Systems, Minneapolis, MN, número de catálogo 202-IL) se añade a una concentración final de 1  $\mu$ g / ml; mAb anti-CD4 (R & D Systems, clon 34930.11, número de catálogo MAB379) se añade a una concentración final de 10  $\mu$ g / ml. Las células se cultivan durante 7-8 días a 37 ° C en 5 % de CO<sub>2</sub> y se añade 1  $\mu$ C de [<sup>3</sup>H] timidina a los pocillos durante las últimas 16 horas de cultivo. Las células se recogen y se determina la incorporación de timidina usando un Packard TopCount. Los datos se expresan como la media y la desviación estándar de las determinaciones por triplicado.

Las muestras de la proteína de fusión de interés se analizan en experimentos separados y se comparan con el tratamiento de control negativo, mAb anti-CD4, que inhibe la proliferación de los linfocitos y el tratamiento de control positivo, IL-2 (ya sea como material recombinante o sobrenadante), que mejora la proliferación de los linfocitos.

#### **Ejemplo 50: Ensayo de la actividad proteasa.**

El siguiente ensayo se puede usar para evaluar la actividad proteasa de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

La cimgografía en gelatina y caseína se realiza esencialmente como se describe (Heusen et al., Anal. Biochem., 102:196 - 202 (1980); Wilson et al., Journal of Urology, 149:653 - 658 (1993)). Las muestras se pasan por geles de 10 % de poliacrilamida / 0,1 % de SDS que contienen 1 % o caseína gelatina, se empapan e tritón al 2,5 % a temperatura ambiente durante 1 hora y en glicina 0,1 M, a pH 8,3 a 37 ° C durante de 5 a 16 horas. Después de la tinción en amido, las áreas negras de la proteólisis aparecen como áreas claras frente al fondo negro-azul. Se usa tripsina (Sigma T8642) como control positivo.

La actividad proteasa se determina también mediante el control de la escisión del éster etílico de n-a-benzoil-L-arginina (BAEE) (Sigma B-4500). Las reacciones se establecen en MNaPO<sub>4</sub> 25 mM, EDTA 1 mM y BAEE 1 mM), pH 7,5. Se añaden las muestras y el cambio en la absorbancia a 260 nm se controla en el espectrofotómetro Beckman DU-6 en modo de tiempo -impulso. La tripsina se usa como control positivo.

Ensayos adicionales basados en la liberación de péptidos solubles en ácido a partir de caseína o hemoglobina medidos como la absorbancia a 280 nm o colorimétricamente usando el procedimiento de Folin se llevan a cabo como se describe en Bergmeyer, et al., Methods of Enzymatic Analysis, 5 (1984). Otros ensayos implican la solubilización de sustratos cromógenos (Ward, Applied Science, 251-317 (1983)).

#### **Ejemplo 51: Identificación de la especificidad de sustrato de la serina proteasa**

Los procedimientos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento pueden usarse para determinar la especificidad de sustrato de la proteína de fusión de albúmina de la presente invención que tiene actividad de serina proteasa. Un procedimiento preferido para determinar la especificidad de sustrato es mediante el uso de bibliotecas combinatorias de exploración posicional sintéticas como se describe en el documento GB 2 324 529 (incorporado en el presente documento en su totalidad).

#### **Ejemplo 52: Ensayos de unión a ligando**

El siguiente ensayo se puede usar para evaluar la actividad de unión al ligando de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Los ensayos de unión a ligando proporcionan un procedimiento directo para determinar la farmacología del receptor

y se pueden adaptar a un formato de rendimiento elevado. El ligando purificado para una proteína de fusión de albúmina de la invención se marca radioactivamente hasta una actividad específica alta (50-2000 Ci/mmol) para los estudios de unión. Después se realiza una determinación de que el proceso de radiomarcado no disminuye la actividad del ligando hacia la proteína de fusión. Las condiciones de ensayo para tampones, iones, pH y otros moduladores tales como nucleótidos se optimizan para establecer una proporción señal-ruido procesable para fuentes de polipéptidos de membrana y de células enteras. Para estos ensayos, la unión polipeptídica específica se define como la radioactividad total asociada menos la radioactividad medida en presencia de un exceso de ligando de competición sin marcar. Cuando sea posible, se usa más de un ligando de competición para definir la unión inespecífica residual.

#### 10 **Ejemplo 53: Ensayo funcional en ovocitos de *Xenopus***

Transcritos de ARN protegidos de moldes plasmídicos linealizados que codifican una proteína de fusión de albúmina de la invención se sintetizan *in vitro* con ARN polimerasas de acuerdo con procedimientos estándar. Los transcritos *in vitro* se suspenden en agua a una concentración final de 0,2 mg / ml. Se extraen lóbulos ováricos de sapos hembras adultas, se obtienen oocitos desfoliculados en estadio V y los transcritos de ARN (10 ng / oocito) se inyectan en un bolo de 50 nl usando un aparato de microinyección. Se usan pinzas de voltaje de dos electrodos para medir las corrientes de los oocitos de *Xenopus* individuales en respuesta a la exposición al agonista polipeptídico y a la proteína de fusión. Los registros se realizan medio de Barth sin Ca<sup>2+</sup> a temperatura ambiente. El sistema de *Xenopus* se puede usar para cribar ligandos conocidos y extractos de tejido / célula para la activación de ligandos.

#### **Ejemplo 54: Ensayos microfisiométricos.**

La activación de una amplia variedad de sistemas de mensajero secundario se traduce en la extrusión de pequeñas cantidades de ácido a partir de una célula. El ácido formado es en gran medida resultado de la mayor actividad metabólica requerida para alimentar el proceso de señalización intracelular. Los cambios de pH en los medios que rodean a la célula son muy pequeños pero detectables con el microfisiómetro CYTOSENSOR (Molecular Devices Ltd., Menlo Park, Calif.). El CYTOSENSOR es, por lo tanto, capaz de detectar la capacidad de una proteína de fusión de la albúmina de la invención para activar mensajeros secundarios que se acoplan a una vía de señalización intracelular que usa energía.

#### **Ejemplo 55: Detección selectiva en sobrenadante de extracto/celular.**

Existe un gran número de receptores de mamíferos que, hasta ahora, no existe un ligando de activación afín (agonista). Por lo tanto, los ligandos activos para estos receptores pueden no estar incluidos dentro de los bancos como ligandos identificados hasta la fecha. De acuerdo con lo anterior, las proteínas de fusión de albúmina de la invención también pueden someterse a detección selectiva funcional (usando calcio, AMPc, microfisiómetro, electrofisiología de oocitos, etc, cribados funcionales) contra extractos tisulares para identificar los ligandos naturales para la porción de proteína terapéutica y / o la porción de proteína de albúmina de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Los extractos que producen respuestas funcionales positivas pueden subfraccionarse secuencialmente hasta aislar e identificar un ligando.

#### **Ejemplo 56: Ensayo de unión a ATP.**

El siguiente ensayo se puede usar para evaluar la actividad de unión a ATP de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

La actividad de una proteína de fusión de la albúmina de la invención de unión a ATP puede detectarse usando el ensayo de unión a ATP se describe en la patente de EE.UU. 5.858.719, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Brevemente, la unión del ATP a una proteína de fusión de albúmina de la invención se mide mediante marcaje de fotoafinidad con 8-azido-ATP en un ensayo de competición. Las mezclas de reacción que contienen 1 mg / ml de la proteína de transporte ABC se incuban con diferentes concentraciones de ATP, o el análogo de ATP no hidrolizable adenil-5'-imidodifato durante 10 minutos a 4 ° C. Se añade una mezcla de 8-azido-ATP (Sigma Chem.Corp., St. Louis, MO.) más 8-azido-ATP (<sup>32</sup>P-ATP) (5 mCi / μmol, ICN, Irvine CA) a una concentración final de 100 μM y alícuotas de 0,5 ml se colocan en los pocillos de una placa de porcelana colocada en hielo. La placa se irradia usando una lámpara de onda corta de 254 nm UV a una distancia de 2,5 cm de la placa durante dos intervalos de un minuto con un intervalo de enfriamiento de un minuto en el medio. La reacción se para mediante la adición de ditiotritol hasta una concentración final de 2 mM. Las incubaciones se someten a electroforesis en SDS-PAGE, se secan y se realizan las autorradiografías. Las bandas de proteína correspondientes a las proteínas de fusión de albúmina de la invención se escinden y la radioactividad se cuantifica. Una disminución en la radiactividad con el aumento de ATP o adenil-5'-imidodifosfato proporciona una medida de la afinidad del ATP por la proteína de fusión.

#### **Ejemplo 57: Ensayo de fosforilación.**

Con el fin de analizar la actividad de fosforilación de una proteína de fusión de albúmina de la invención se usa un ensayo de fosforilación como se describe en la patente de EE.UU. 5.958.405 (que se incorpora aquí por referencia). Brevemente, la actividad de fosforilación puede medirse mediante fosforilación de un sustrato de proteína usando



<sup>32</sup>P-ATP-gamma marcado y cuantificación de la radiactividad incorporada usando un contador gamma de radioisótopos. La proteína de fusión de la invención se incuba con el sustrato de proteína, <sup>32</sup>P-ATP y un tampón de quinasa. El <sup>32</sup>P incorporado en el sustrato se separa después del <sup>32</sup>P-ATP mediante electroforesis y el <sup>32</sup>P incorporado se cuenta y se compara con un control negativo. Los recuentos de radiactividad por encima del control negativo son indicativos de actividad de fosforilación de la proteína de fusión.

**Ejemplo 58: Detección de la actividad de fosforilación (activación) de una proteína de albúmina de fusión de la invención en presencia de ligandos polipeptídicos.**

Los procedimientos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento pueden usarse para determinar la actividad de fosforilación de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención. Un procedimiento preferido de determinar la actividad de fosforilación es mediante el uso del ensayo de fosforilación de la tirosina como se describe en el documento US 5.817.471 (incorporado a la presente memoria por referencia).

**Ejemplo 59: Identificación de las proteínas de transducción de proteínas que interactúan con una proteína de fusión albúmina de la presente invención**

Las proteínas de fusión de albúmina de la invención pueden servir como herramientas de investigación para la identificación, caracterización y purificación de las proteínas o proteínas receptoras de la vía de transducción de señales. Brevemente, una proteína de fusión marcada de la invención es útil como ureactivo para la purificación de moléculas con las que interactúa. En una realización de purificación por afinidad, una proteína de fusión de albúmina de la invención está acoplada covalentemente a una columna de cromatografía. El extracto sin células derivado de supuestas células diana, tales como tejidos de carcinoma, se pasa por columna y las moléculas con la afinidad adecuada se unen a la proteína de fusión de albúmina. El complejo de la proteína se recupera de la columna, se disocia y la molécula recuperada se somete a secuenciación de la proteína en N-terminal. Esta secuencia de aminoácidos se usa después para identificar la molécula capturada o para diseñar sondas de oligonucleótidos degenerados para clonar el gen relevante a partir de una biblioteca de ADNc apropiada.

**Ejemplo 60: Bioensayo de IL-6.**

En la técnica se conocen diversos ensayos para analizar los efectos proliferativos de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Por ejemplo, uno de tales ensayos es el bioensayo de IL-6 como se describe por Marz et al. (Proc.Natl.Acad.Sci, EE.UU., 95: 3251-56 (1998)). Después de 68 horas, a 37 ° C, el número de células viables se mide mediante la adición de la sal de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT) e incubando durante otras 4 horas, a 37 ° C. Las células B9 se lisan mediante SDS y la densidad óptica se mide a 570 nm. Se usan los controles que contienen IL-6 (positivo) y sin citocina (negativo). Brevemente, las células murinas B9 dependientes de IL-6 se lavan tres veces en medio sin IL-6 y se siembra en placas a una concentración de 5.000 células por pocillo en 50 µl y se añaden 50 µl de la proteína de fusión de la invención. La proliferación potenciada en la o las muestras de ensayo (que contienen una proteína de fusión de albúmina de la invención) en relación con el control negativo es indicativa de efectos proliferativos mediados por la proteína de fusión.

**Ejemplo 61: Soporte de supervivencia de neuronas de embriones de pollo.**

Para analizar si la viabilidad celular neuronal simpática está soportada por una proteína de fusión de albúmina de la invención se puede usar un ensayo de supervivencia de neuronas en embrión de pollo de Senaldi *et al* may be utilized (Proc. Natl Acad. Sci., U.S.A., 96:11458 - 63 (1998), que se incorpora por referencia en el presente documento). Brevemente, las neuronas motoras y simpáticas se aíslan de embriones de pollo, se resuspenden en medio L15 (con 105 de FCS, glucosa, selenio sódico, progesterona, conalbúmina, putrescina e insulina; Life Technologies, Rockville, MD.) y medio Eagle modificado de Dulbecco [con 10 % de FCS, glutamina, penicilina y HEPES 25 mM (pH 7,2); Life Technologies, Rockville, MD.], respectivamente y se incuban a 37° en 5 % de CO<sub>2</sub> en presencia de concentraciones diferentes de la proteína de fusión purificada de la invención, así como un control negativo que carece de citocinas. Tras 3 días se determina la supervivencia de las neuronas mediante evaluación de la morfología celular y mediante el uso del ensayo colorimétrico de Mosmann (Mosmann, T., J. Immunol. Methods, 65:5563 (1983)). La viabilidad de las células neuronales potenciada en comparación con los controles que carecen de citocinas es indicativa de que la proteína de fusión de albúmina potencia la supervivencia de las células neuronales.

**Ejemplo 62: Ensayo de LA actividad fosfatasa.**

El siguiente ensayo se puede usar para evaluar la actividad de serina/treonina fosfatasa (PTPasa) de una proteína de fusión de albúmina de la invención.

Con el fin de analizar la actividad de serina / treonina fosfatasa (PTPasa), se pueden usar ensayos muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de serina / treonina fosfatasa (PSPasa) de una proteína de fusión de la albúmina de la invención puede medirse usando un kit de ensayo PSPasa de New England Biolabs, Inc. La proteína básica de mielina (MyBP), un sustrato para PSPasa, se fosforila en los residuos de serina y treonina con la proteína quinasa dependiente de AMPc en presencia de [<sup>32</sup>P] ATP. La actividad de la serina/ treonina fosfatasa se determina después mediante la medición de la liberación de fosfato inorgánico a partir de la MyBP marcada con <sup>32</sup>P.

**Ejemplo 63: Interacción de las serina/treonina fosfatasa con otras proteínas**

Las proteínas de fusión de la invención que tienen actividad serina / treonina fosfatasa (por ejemplo, tal como se determina en el Ejemplo 102) son útiles, por ejemplo, como herramientas de investigación para la identificación, caracterización y purificación de proteínas adicionales de interaccionan o proteínas receptoras, u otras proteínas de la vía de transducción de señales. Brevemente, una proteína de fusión de la invención marcada es útil como reactivo para la purificación de moléculas con las que interacciona. En una realización de purificación por afinidad, una proteína de fusión de albúmina de la invención está acoplada covalentemente a una columna de cromatografía. El extracto sin células derivado de supuestas células diana, tales como como células neuronales o hepáticas, se hace pasar por la columna y las moléculas con la afinidad apropiada se unen a la proteína de fusión. El complejo de la proteína de fusión se recupera de la columna disociada y la molécula recuperada se somete a secuenciación proteica por el extremo N. Esta secuencia de aminoácidos se usa después para identificar la molécula capturada o para diseñar sondas de oligonucleótidos degenerados para clonar el gen relevante a partir de una biblioteca de ADNc apropiada.

**Ejemplo 64: Ensayo de actividad heparanasa.**

En la técnica se conocen numerosos ensayos que se pueden usar para analizar la actividad heparanasa de una proteína de fusión de albúmina de la invención. En un ejemplo, la actividad heparanasa de una proteína de fusión de albúmina de la invención, se ensaya como se describe por Vlodavsky et al., (Vlodavsky et al., Nat.Med, 5: 793-802 (1999)), Brevemente, lisados celulares, medio acondicionado, células intactas ( $1 \times 10^6$  células por placa de 35 mm), sobrenadante de cultivo celular, o la proteína de fusión purificada se incuban durante 18 horas a 37 ° C, pH 6.2 a 6.6, con ECM marcada con  $^{35}\text{S}$  o con proteoglicanos I mázimos derivados de ECM soluble. El medio de incubación se centrifuga y el sobrenadante se analiza por filtración en gel en una columna de Sepharose CL-6B (0,9 x 30 cm). Las fracciones se eluyeron con PBS y se mide su radiactividad. Degradation fragmentos de cadenas laterales de sulfato de heparán se eluyen de Sepharose 6B a 0,5  $<K_{av}<0,8$  (pico II). Cada experimento se hace al menos tres veces. Fragmentos de degradación correspondientes a "pico II", como se describe por Vlodavsky et al., Es indicativo de la actividad de una proteína de fusión de la albúmina de la invención en la escusión de heparán sulfato.

**Ejemplo 65: Inmovilización de biomoléculas.**

Este ejemplo proporciona un procedimiento para la estabilización de una proteína de fusión de albúmina de la invención en construcciones de bicapas lipídicas de células no huésped (véase, por ejemplo, Bieri et al., Nature Biotech 17:11051108 (1999), incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad) que se pueden adaptar para el estudio de las proteínas de fusión de la invención en los diversos ensayos funcionales descritos anteriormente. Brevemente, se usa química específica de carbohidratos para biotilación para confinar una marca de biotina a una proteína de fusión de albúmina de la invención, de modo que permite una orientación uniforme tras la inmovilización. Una solución 50uM de una proteína de fusión de albúmina de la invención en membranas lavadas se incuban en NaIO<sub>4</sub> 20 mM y 1,5 mg/ml (4mM) de BACH o 2 mg/ml (7,5mM) de biotina-hidrazida durante 1 hora a temperatura ambiente (volumen de reacción 150 ul). Después, se dializa la muestra Pierce Slidealizer Cassett, corte a 10 kDa; Pierce Chemical Co., Rockford IL) a 4 °C primero durante 5 h, intercambiando el tampón tras cada hora y por último, durante 12 horas contra 500 ml de tampón R (NaCl 0,15 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, fosfato sódico 10 mM, pH 7) Justo antes de añadir a una cubeta, la muestra se diluye a 1:5 en tampón ROG50 (tampón R suplementado con octilgucósido 50 mM).

**Ejemplo 66: Ensayo de la actividad metaloproteinasas.**

Las metaloproteinasas son hidrolasas de péptidos que usan iones metálicos, tales como  $\text{Zn}^{2+}$ , como mecanismo catalítico. La actividad de la metaloproteinasas de una proteína de fusión de albúmina de la presente invención se puede ensayar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Se proporcionan los siguientes procedimientos de ejemplo:

**45 *Proteólisis de la alfa-2-macroglobulina***

Para confirmar la actividad proteasa, una proteína de fusión purificada de la invención se mezcla con el sustrato alfa-2-macroglobulina (0,2 unidades / ml; Boehringer Mannheim, Alemania) en tampón de ensayo 1x (50 mM HEPES, pH 7,5, NaCl 0,2 M, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM de ZnCl<sub>2</sub> y 0,05 % de Brij-35) y se incubó a 37 ° C durante 1-5 días. La tripsina se usa como control positivo. Los controles negativos solo contienen alfa-2-macroglobulina en tampón de ensayo. Las muestras se recogen y se hirvieron en tampón de muestra de SDS-PAGE que contenía 5 % de 2-mercaptoetanol durante 5 min y luego se cargó en 8 % de gel de SDS-poliacrilamida. Después de la electroforesis, las proteínas se visualizaron por tinción con plata. La proteólisis es evidente por la aparición de bandas de peso molecular inferior en comparación con el control negativo.

***Inhibición de la proteólisis alfa-2-macroglobulina por los inhibidores de las metaloproteinasas***

55 Inhibidores de la metaloproteinasas conocidos (quelantes de metales (EDTA, EGTA y HgCl<sub>2</sub>), Inhibidores de la metaloproteinasas de péptidos (TIMP-1 y TIMP-2), inhibidores de MMP y pequeñas moléculas comerciales) también se pueden usar para caracterizar la actividad proteolítica de una proteína de fusión de albúmina de la invención. Tres

5 inhibidores de MMP sintéticos que se pueden usar son MMP inhibidor I, [ $IC_{50}$ = 1,0  $\mu$ M contra la MMP-1 y MMP-8;  $IC_{50}$ = 30  $\mu$ M contra MMP-9;  $IC_{50}$ = 150  $\mu$ M contra MMP-3]; MMP-3 (estromelisina-I) inhibidor I [ $IC_{50}$ = 5  $\mu$ M contra MMP-3] y MMP-3 inhibidor II [ $K_i$ = 130 nM frente a MMP-3]; inhibidores disponibles a través de Calbiochem, Catalog # 444250, 444218 y 444225, respectivamente). Brevemente, diferentes concentraciones de los inhibidores de MMP  
 10 pequeñas moléculas se mezclan con una proteína de fusión purificado de la invención (50 $\mu$ g / ml) en 22,9 l de tampón 1x HEPES (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,2 M, 10 mM  $CaCl_2$ , 25 mM de  $ZnCl_2$  y 0,05 % Brij-35) y se incubaron a temperatura ambiente (24 ° C) durante 2-hr, a continuación, se añade y se incuba a 37 ° C durante 20 hr-7.1 l de sustrato de alfa-2-macroglobulina (0,2 unidades / ml) .Las reacciones se detuvieron mediante la adición de tampón de muestra 4x y inmediatamente hervida durante 5 minutos.Después de SDS-PAGE, las bandas de proteína se visualizaron por tinción con plata.

*Ensayo de escisión de sustratos peptídicos fluorogénicos sintéticos*

15 La especificidad de sustrato para las proteínas de fusión de la invención con actividad de metaloproteinasas demostrado puede determinarse usando técnicas conocidas en la técnica, tales como el uso de sustratos peptídicos fluorogénicos sintéticos (de Bachem Bioscience Inc).Sustratos de prueba incluyen, M-1985, M-2225, M-2105, M-2110 y M-2255.Los cuatro primeros son sustratos de las MMP y el último es un sustrato de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) la enzima de conversión (TACE).Estos sustratos se preparan Preferentemente en 1: 1 sulfóxido de dimetilo (DMSO) y agua.Las soluciones de reserva son 50-500 M. Ensayos fluorescentes se realizan mediante el uso de un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 50B equipado con un baño de agua a temperatura constante.El  $\lambda$  de excitación es 328 nm y la emisión es  $\lambda$  393 nm.Brevemente, el ensayo se lleva a cabo mediante la  
 20 incubación de 176 l de tampón 1x HEPES (NaCl 0,2 M, 10 mM  $CaCl_2$ , 0,05 % de Brij-35 y 50 mM HEPES, pH 7.5) con 4 l de solución de sustrato (50 mM) a 25 ° C durante 15 minutos y después añadiendo 20 l de una proteína de fusión purificada de la invención en el ensayo de cuvetta.La concentración final de 1 mM es subestado. Velocidades de hidrólisis iniciales son monitoreados por 30 min.

Listado de secuencias (editado)

25 <110> Human Genome Sciences, Inc. et al  
 <120> Albumin Fusion Proteins  
 <130> DELBF/P35887EPdiv2  
 <150> EP02799966.3  
 <151> 23-12-2002  
 30 <150> 10/775.204 <151> 11-2-2004  
 <150> PCT/US02/40891 <151> 23-12-2002  
 <150> 60/341.811 <151> 21-12-2001  
 <150> 60/360.000 <151> 28-2-2002  
 <150> 60/378.950 <151> 10-5-2002  
 35 <150> 60/398.008 <151> 24-7-2002  
 <150> 60/411.355 <151> 18-9-2002  
 <150> 60/414.984 <151> 2-10-2002  
 <150> 60/417.611 <151> 11-10-2002  
 <150> 60/420.246 <151> 23-10-2002  
 40 <150> 60/423.623 <151> 5-11-2002  
 <150> 60/351.360 <151> 28-1-2002  
 <150> 60/382.617 <151> 24-5-2002  
 <150> 60/383.123 <151> 28-5-2002  
 <150> 60/385.708 <151> 5-6-2002  
 45 <150> 60/394.625 <151> 10-7-2002

<150> 60/411.426 <151> 18-9-2002  
 <150> 60/350.358 <151> 24-1-2002  
 <150> 60/359.370 <151> 26-2-2002  
 <150> 60/367.500 <151> 27-3-2002  
 5 <150> 60/402.131 <151> 9-8-2002  
 <150> 60/402.708 <151> 13-8-2002  
 <150> 60/370.227 <151> 8-4-2002  
 <160> 30  
 <170> Patentin ver. 2.0  
 10 <210> 10  
 <211> 615  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10

atggctggac	ctgccacca	gagcccatg	aagctgatgg	ccctgcagct	gctgctgtgg	60
cacagtgcac	tctggacagt	gcaggaagcc	acccccctgg	gccctgccag	ctccctgccc	120
cagagcttcc	tgtcaagtg	cttagagcaa	gtgaggaaga	tccagggcga	tggcgagcg	180
ctccaggaga	agctgtgtgc	cacctacaag	ctgtgccacc	ccgaggagct	ggtgctgctc	240
ggacactctc	tgggcatccc	ctgggctccc	ctgagcagct	gccccagcca	ggccctgcag	300
ctggcaggct	gcttgagcca	actccatagc	ggccttttcc	tctaccaggg	gctcctgcag	360
gccctggaag	ggatctcccc	cgagtggggt	cccaccttgg	acacactgca	gctggacgtc	420
gccgactttg	ccaccaccat	ctggcagcag	atggaagaac	tgggaatggc	ccctgccctg	480
cagccacccc	agggtgccat	gccggccttc	gcctctgctt	tccagcgccg	ggcaggaggg	540
gtcctggttg	cctcccatct	gcagagcttc	ctggagggtg	cgtaccgcgt	tctacgccac	600
cttgcccagc	cctga					615

15 <210> 226  
 <211> 783  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 226

ES 2 545 090 T3

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

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro  
 165 170 175  
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys  
 180 185 190  
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu  
 195 200 205  
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys  
 210 215 220  
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val  
 225 230 235 240  
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser  
 245 250 255  
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly  
 260 265 270  
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile  
 275 280 285  
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu  
 290 295 300  
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly  
 340 345 350  
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val  
 355 360 365  
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys  
 370 375 380  
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys  
 405 410 415  
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu  
 420 425 430  
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val  
 435 440 445  
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His  
 450 455 460  
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val  
 465 470 475 480  
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg  
 485 490 495  
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe  
 500 505 510  
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala

ES 2 545 090 T3

515 520 525  
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu  
 530 535 540  
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys  
 545 550 555 560  
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala  
 565 570 575  
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe  
 580 585 590  
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly  
 595 600 605  
 Leu Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
 610 615 620  
 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu  
 625 630 635 640  
 Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
 645 650 655  
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser  
 660 665 670  
 Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His  
 675 680 685  
 Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile  
 690 695 700  
 Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala  
 705 710 715 720  
 Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala  
 725 730 735  
 Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala  
 740 745 750  
 Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser  
 755 760 765  
 Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 770 775 780

<210> 442

<211> 204

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 442

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro  
 20 25 30  
 Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu  
 35 40 45  
 Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys  
 50 55 60

ES 2 545 090 T3

Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser  
 85 90 95  
 Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu  
 100 105 110  
 Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu  
 115 120 125  
 Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala  
 130 135 140  
 Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg  
 165 170 175  
 Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu  
 180 185 190  
 Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 195 200

<210> 665

<211> 38

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 665

gaattcgtcg acaaaagaac cccctgggc cctgccag 83

<210> 666

<211> 58

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 666

aagcttatcg atgagcaacc tcaactctgt gtgcatcggg ctgggcaagg tggcgtag 58

<210> 667

15 <211> 37

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 667

aagctgcctt aggcttaacc cccctgggcc ctgccag 37

20 <210> 668

<211> 38

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 668

25 ggcgcggcgc cgctcaggg ctgggcaagg tggcgtag 38



<210> 1037

<211> 1782

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 1037

```

gatgcacaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa 60
gccttgggtg tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta 120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa 180
aatttgagaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactcct 240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa 300
tgcttcttgc aacacaaaaga tgacaaccca aacctcccc gattggtgag accagaggtt 360
gatgtgatgt cactgccttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaaa atacttatat 420
gaaattgccca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg 480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctggtgccca 540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaaatgt 600
gccagctccc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtggc tcgcctgagc 660
cagagatttc ccaaagctga gtttgagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa 720
gtccacacgg aatgctgccca tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt 780
gcccaagtata tctgtgaaaa tcaggattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa 840
aaacctctgt tggaaaaatc ccactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgectgct 900
gacttgccct cattagctgc tgattttggt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct 960
gaggcaaagg atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcatcctgat 1020
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc 1080
tgtgcccgtg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctcct 1140
gtggaagagc ctcagaattt aatcaacaa aactgtgagc tttttgagca gcttggagag 1200
tacaaaattcc agaatgctctc attagtctgt tacaccaaga aagtaccca agtgtcaact 1260
ccaactcttg tagaggtctc aagaaaacct ggaaaagtgg gcagcaaatg ttgtaaacat 1320
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggtcct gaaccagtta 1380
tgtgtgttgc atgagaaaaac gccagtaagt gacagagtca caaatgctg cacagagtcc 1440
ttggtgaaca ggcgacctg cttttcagct ctggaagtgc atgaaacata cgttcccaa 1500
gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag 1560
agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagcttgtga aacacaagcc caaggcaaca 1620
aaagagcaac tgaagctgt tatggatgat ttcgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag 1680
gctgacgata aggagacctg ctttgcggag gagggtaaaa aacttgttgc tgcaagtcaa 1740
gctgccttag gcttataaca tctacattta aaagcatctc ag 1782

```

<210> 1038

<211> 585

<212> PRT

10 <213> Homo Sapiens

<400> 1038

ES 2 545 090 T3

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

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala  
 165 170 175  
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser  
 180 185 190  
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu  
 195 200 205  
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro  
 210 215 220  
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp  
 245 250 255  
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser  
 260 265 270  
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His  
 275 280 285  
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser  
 290 295 300  
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
 325 330 335  
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
 340 345 350  
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
 355 360 365  
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
 370 375 380  
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
 385 390 395 400  
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
 405 410 415  
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
 420 425 430  
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
 435 440 445  
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
 450 455 460  
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
 485 490 495  
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
 500 505 510  
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
 515 520 525  
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
 530 535 540  
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
 545 550 555 560  
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val  
 565 570 575  
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
 580 585

<210> 1043  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<221> Misc\_Structure  
<223> Oligonucleótido sintético usado para alterar la restricción  
sites in pPPC0007  
<400> 1043

10 aagctgcctt aggctataa taaggcgcgc cggccggccg ttaaactaa gcttaattct 60  
<210> 1044  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<221> Misc\_Structure  
<223> Oligonucleótido sintético usado para alterar la restricción  
sites in pPPC0007  
<400> 1044

20 agaattaagc ttagttaaa cggccggccg gcgcgcccta ttataagcct aaggcagctt 60  
<210> 1045  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<221> primer\_bind  
<223> cebador directo útil para generación de albúmina  
Proteína de fusión en la que el resto de albúmina está en N-terminal 1 de la proteína terapéutica  
<220>

30 <221> misc\_feature  
<222> (18)  
<223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>  
<221> misc\_feature

35 <222> (19)  
<223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>

- <221> misc\_feature
- <222> (20)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- 5 <221> misc\_feature
- <222> (21)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- 10 <222> (22)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (23)
- 15 <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (24)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (25)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- 25 <221> misc\_feature
- <222> (26)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- 30 <222> (27)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (28)
- 35 <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature

<222> (29)  
<223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>  
<221> misc\_feature

5 <222> (30)  
<223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (31)

10 <223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (32)  
<223> n equivale a a,t,g, o c

15 <400> 1045  
aagctgcctt aggcttannn nnnnnnnnnn nn 32  
<210> 1046  
<211> 51  
<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<221> primer\_bind  
<223> cebador inverso útil para la generación de la proteína de fusión de albúmina en la que el resto de albúmina está en N-terminal de la proteína terapéutica

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (37)  
<223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>

30 <221> misc\_feature  
<222> (38)  
<223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>  
<221> misc\_feature

35 <222> (39)  
<223> n equivale a a,t,g, o c  
<220>

- <221> misc\_feature
- <222> (40)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- 5 <221> misc\_feature
- <222> (41)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- 10 <222> (42)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (43)
- 15 <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (44)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (45)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- 25 <221> misc\_feature
- <222> (46)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- 30 <222> (47)
- <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (48)
- 35 <223> n equivale a a,t,g, o c
- <220>
- <221> misc\_feature

<222> (49)

<223> n equivale a a,t,g, o c

<220>

<221> misc\_feature

5 <222> (50)

<223> n equivale a a,t,g, o c

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)

10 <223> n equivale a a,t,g, o c

<400> 1046

gcgcgcggtt aaacggccgg ccggcgcgcc ttattannnn nnnnnnnnn n 51

<210> 1094

<211> 609

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1094



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

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser  
 245 250 255  
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly  
 260 265 270  
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile  
 275 280 285  
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu  
 290 295 300  
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp  
 305 310 315  
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly  
 340 345 350  
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val  
 355 360 365  
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys  
 370 375 380  
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys  
 405 410 415  
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu  
 420 425 430  
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val  
 435 440 445  
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His  
 450 455 460  
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val  
 465 470 475 480  
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg  
 485 490 495  
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe  
 500 505 510  
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala  
 515 520 525  
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu  
 530 535 540  
 Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys  
 545 550 555 560  
 Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala  
 565 570 575  
 Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe  
 580 585 590  
 Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly  
 595 600 605

Leu

<210> 1111

<211> 24

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1111

ES 2 545 090 T3

Met Lys Trp Val Ser Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala  
 1 5 10 15

Tyr Ser Arg Ser Leu Asp Lys Arg  
 20

<210> 1112

<211> 733

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 1112

```

gggatccgga gcccaaatct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60
aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga 120
tctcccggac tcctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg 180
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg 240
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca accccatcg 360
agaaaacccat ctccaagacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 420
catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480
atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga 540
ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag ctcaccgtgg 600
acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg 660
acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgctctcggg taaatgagtg cgacggccgc 720
gactctagag gat 733
  
```

<210> 1113

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Site

<222> (3)

15 <223> xaa equivale a cualquiera de los veinte L-aminoácidos de origen natural

<400> 1113

Trp Ser Xaa Trp Ser  
 1 5

<210> 1114

<211> 86

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer\_Bind

25 <223> Secuencia sintética con 4 copias 4 en tándem del sitio de unión GAS hallado en el promotor IRF1 (Rothman et al., Immunity 1:457-468 (1994)), 18 nucleótidos complementarios al promotor temprano de SV40 y un sitio de restricción para xho.

<400> 1114

```

gcgccctcgag atttccccga aatctagatt tccccgaaat gatttccccg aatgatttc 60
cccgaatat ctgccatctc aattag 86
  
```

<210> 1115

ES 2 545 090 T3

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> primer\_Bind

<223> secuencia sintética complementaria al promotor temprano de SV40; incluye un sitio de restricción para Hind III.

<400> 1115

gcggcaagct tttgcaaag cctaggc 27

10 <210> 1116

<211> 271

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> Protein\_Bind

<223> Promotor sintético para uso en ensayos biológicos; incluye sitios de unión a GAS en el promotor IRF1 (Rothman et al., Immunity 1:457-468 (1994)).

<400> 1116

ctcgagattt	ccccgaaatc	tagatttccc	cgaaatgatt	tccccgaaat	gatttccccg	60
aaatatctgc	catctcaatt	agtcagcaac	catagtcctcg	cccctaactc	cgcccatccc	120
gcccctaact	ccgcccagtt	ccgcccattc	tccgccccat	ggctgactaa	tttttttat	180
ttatgcagag	gccgaggccg	cctcggcctc	tgagctattc	cagaagtagt	gaggaggctt	240
ttttggaggc	ctaggccttt	gcaaaaagct	t			271

20 <210> 2138

<211> 394

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2138

gcggccgccg	gatgcaaggg	ttcgaatccc	ttagctctca	ttatTTTTTg	ctttttctct	60
tgaggtcaca	tgatcgcaaa	atggcaaatg	gcacgtgaag	ctgtcgatat	tggggaactg	120
tggtgggttg	caaatgacta	attaagttag	tcaagggcgc	atcctcatga	aaactgtgta	180
acataataac	cgaagtgtcg	aaaaggtggc	accttgcca	attgaacacg	ctcgatgaaa	240
aaaataagat	atatataagg	ttaagtaaag	cgctctgttag	aaaggaagtt	tttcttttt	300
cttgctctct	tgtcttttca	tctactattt	ccttcgtgta	atacagggtc	gtcagataca	360
tagatacaat	tctattacc	ccatccatac	aatg			394

25

<210> 2139

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2139

Leu Asp Lys Arg  
1

<210> 2140

ES 2 545 090 T3

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2140

5

Leu Glu Lys Arg  
1

<210> 2143

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 2143

Asp Ala His Lys Ser  
1 5

<210> 2144

<211> 5

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 2144

Thr Pro Leu Gly Pro  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia líder y una proteína de fusión de albúmina que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia líder HSA (seroalbúmina humana)/kex2, un polinucleótido que codifica seroalbúmina humana madura, un polinucleótido que codifica un factor estimulador de colonias de granulocitos maduro (G-CSF) y una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia promotora, una secuencia marcadora seleccionable y una región para terminación de transcripción, en la que la secuencia líder HSA (seroalbúmina humana)/kex2 codificada está fusionada al extremo N-terminal de seroalbúmina humana madura, en la que dicha seroalbúmina humana madura está fusionada al extremo N-terminal de dicho G-CSF maduro y en la que dicha proteína de fusión de albúmina tiene actividad de G-CSF, opcionalmente en la que la molécula de ácido nucleico es parte de un casete de expresión.
2. Una molécula de ácido nucleico que comprende el ADNc contenido en el número de depósito en la ATCC PTA-3766.
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2.
4. Un vector de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende un promotor y una región de terminación asociado operativamente a una molécula de ácido nucleico, comprendiendo el ácido nucleico la construcción contenida en el número de depósito en la ATCC PTA-3766, en la que dicha secuencia líder es una secuencia líder HSA/kex2 híbrida que comprende los aminoácidos de la SEC ID N.º: 1111.
5. Un vector de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende un promotor y una región de terminación asociados operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia líder y una proteína de fusión de albúmina que comprende aminoácidos 1 a 783 de SEC ID N.º: 226, en el que dicha secuencia líder es una secuencia líder HSA/kex2 híbrida que comprende los aminoácidos de SEC ID N.º: 1111.
6. Un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dicho promotor es un promotor PRB1.
7. Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicho vector es un vector de expresión pSAC35.
8. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.
9. La célula huésped de la reivindicación 8, en la que dicha célula huésped es una célula de levadura, opcionalmente en la que la célula de levadura es una *Saccharomyces cerevisiae* y/o en la que la célula de levadura es deficiente en glucosilación y/o en la que la célula de levadura es deficiente en proteasa.
10. Un procedimiento de producción de una proteína de fusión de albúmina que comprende:
- (a) cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de seroalbúmina bovina; y
- (b) aislar la proteína de fusión de albúmina.
11. La proteína de fusión albúmina-G-CSF codificada por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en medicina.
12. La proteína de fusión albúmina-G-CSF codificada por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios, cáncer, leucemia, tal como leucemia mielocítica, leucemia mielógena aguda y leucemia linfoblástica aguda, neutropenia, tal como neutropenia primaria (por ejemplo síndrome de Kostmann), neutropenia secundaria, neutropenia en pacientes infectados por el VIH y neutropenia asociada con quimioterapia, infecciones asociadas con neutropenia, mielodisplasia, enfermedades y trastornos autoinmunes, soriasis, cicatrización de heridas, linfoma, tal como linfoma no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin o enfermedad de almacenamiento de glucógeno;
- o para su uso en la prevención de trastornos inflamatorios, neutropenia, tal como neutropenia en pacientes infectados con VIH o neutropenia asociada con quimioterapia;
- o para su uso en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias.

1 GAT GCA CAC AAG ACT GAG GTT CCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA AAT TTC AAA 60  
 1 D A H K S E V A H R F K D L G E E N F K 20  
  
 61 GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CRG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA 120  
 21 A L V L I A F A Q Y L Q Q C P F E D H V 40  
  
 121 AAA TTA GTG ANT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GCT GAT GAG TCA GCT GAA 180  
 41 K L V N E V T E F A K T C V A D E S A E 60  
  
 181 AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT CTT 240  
 61 N C D K S L K S L H T L F G D K L C T V A T L 80  
  
 241 CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AAT GAA 300  
 81 R E T Y G E M A D C C A K Q E P E R N E 100  
  
 301 TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCR AAC CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT 360  
 101 C F L Q H K D D N P N L P R L V R P E V 120  
  
 361 GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT 420  
 121 D V M C T A F H D N E E T F L K K Y L Y 140  
  
 421 GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA ACC 480  
 141 E I A R R H F Y F Y A P E L L F F A K R 160

Figura 1A

401 TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA 540  
 161 Y K A A F T E C Q A A D K A A C L L P 180

541 AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT CAA GGG AAG GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT 600  
 181 K L D E L R D E G K A S S A K Q R L K C 200

601 GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC 660  
 201 A S L Q K F G E R A F K A W A V A R L S 220

661 CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA 720  
 221 Q R F P K A E F A E V S K L V T D L T K 240

721 GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT 780  
 241 V H T E C C H G D L L E C A D D R A D L 260

781 GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA 840  
 261 A K Y I C E N Q D S I S S K L K E C C E 280

841 AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT 900  
 281 K P L L E K S H C I A E V E N D E H P A 300

901 GAC TTG CCT TCA TTA GCT GCT GAT TTT CTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT 960  
 301 D L P S L A A D F V E S K D V C K N Y A 320

Figura 1B



961 GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT 1020  
 321 E A K D V F L G M F L Y E Y A R R H P D 340  
  
 1021 TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GRG AAG TGC 1080  
 341 Y S V V L L L R L A K T Y E T L E K C 360  
  
 1081 TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT 1140  
 361 C A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L 380  
  
 1141 GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA GAG 1200  
 381 V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G E 400  
  
 1201 TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG TCA ACT 1260  
 401 Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T 420  
  
 1261 CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT 1320  
 421 P T L V E V S R N L G K V G S K C C K H 440  
  
 1321 CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA 1380  
 441 P E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L 460  
  
 1381 TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG TCC 1440  
 461 C V L H E K T P V S D R V T K C C T E S 480

Figura 1C

1441 TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC AAA 1500  
 481 L V N R R P C F S A L E V D E T Y V P K 500

1501 GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG 1560  
 501 E F N A E T F T F H A D I C T L S E K E 520

1561 AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA 1620  
 521 R Q I K K Q T A L V E L V K H K P K A T 540

1621 AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG 1680  
 541 K E Q L K A V M D D F A A F V E K C C K 560

1681 GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA 1740  
 561 A D U K E T C F A E E G K K L V A A S Q 580

1741 GCT GCC TTA GGC TTA TAA CAT CTA CAT TTA AAA GCA TCT CAG 1782  
 581 A A L G L 505

Figura 1D

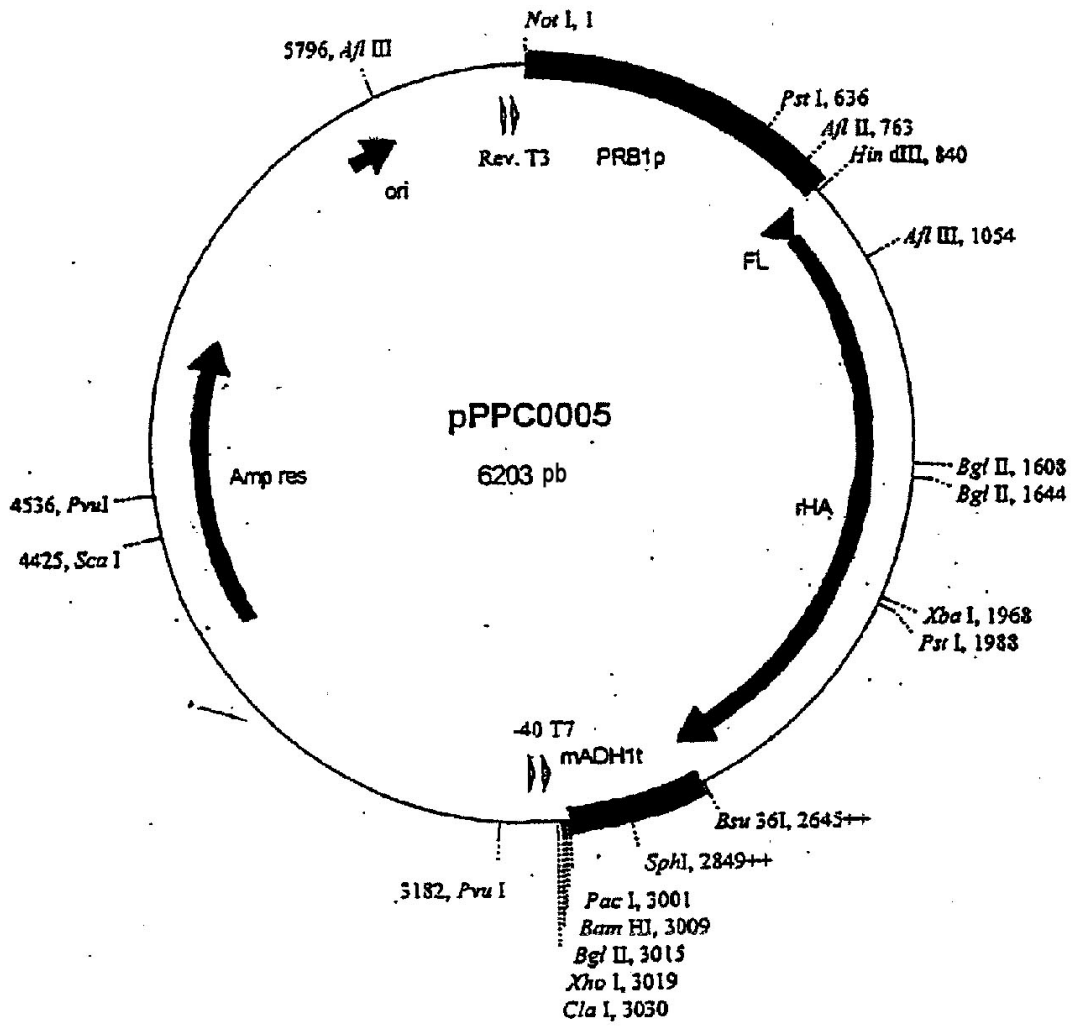


Figura 2

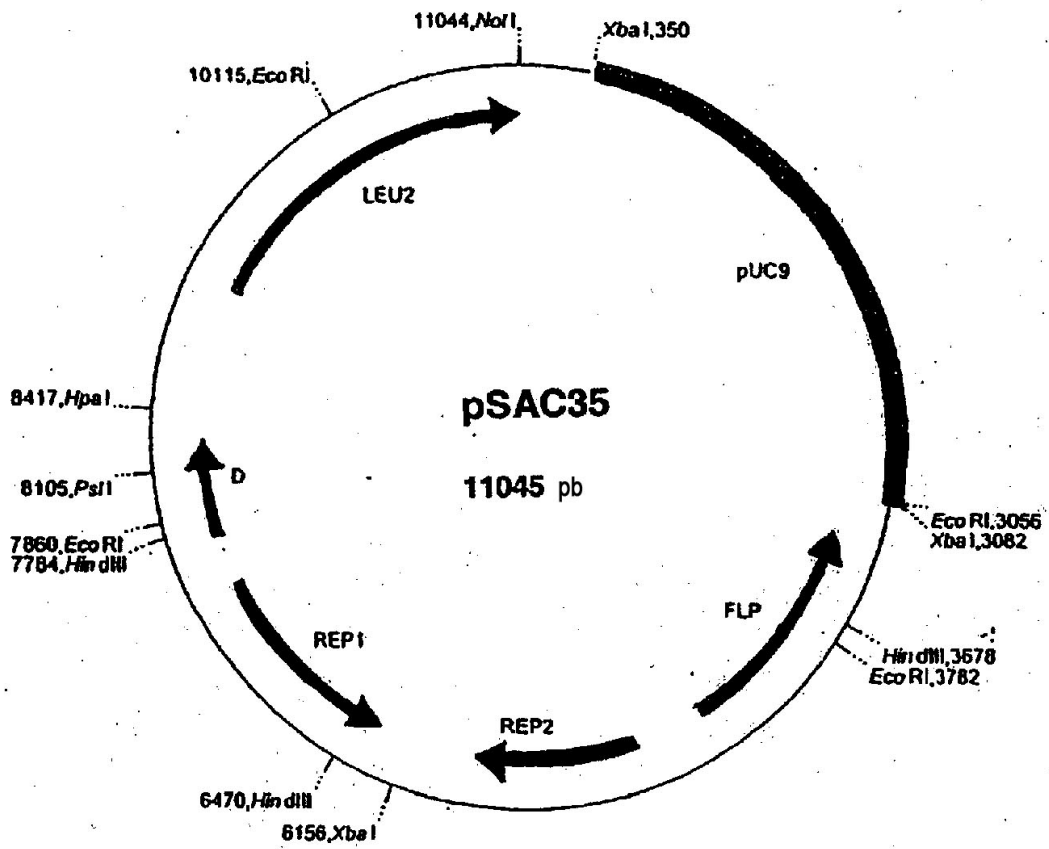


Figura 3

Respuesta de células NFS-60 a proteínas de fusión de GCSF albúmina (sobrenadantes)

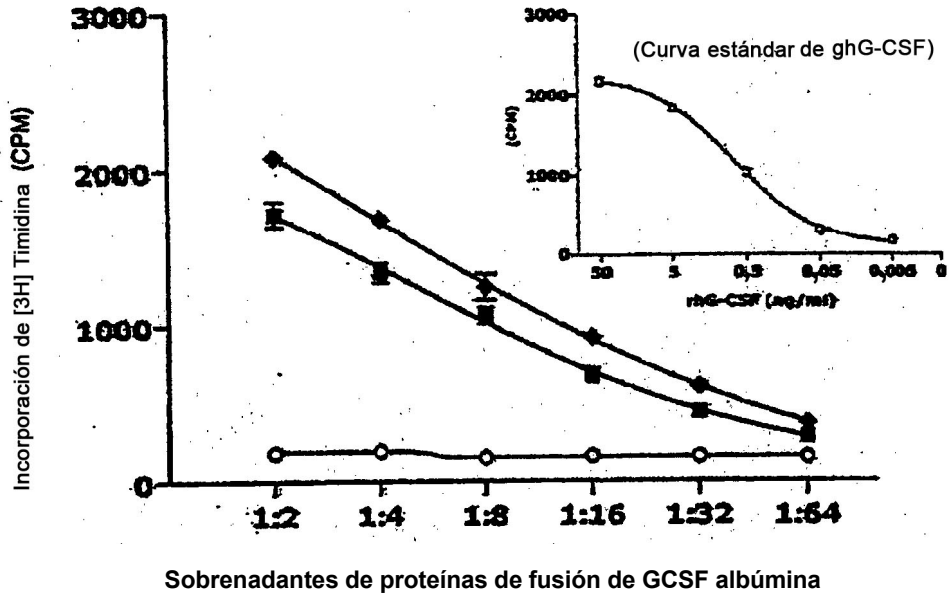


Figura 4

Efectos de proteína de fusión de GCSF albúmina (fusión de GCSF) en recuento de glóbulos blancos totales (WBC)

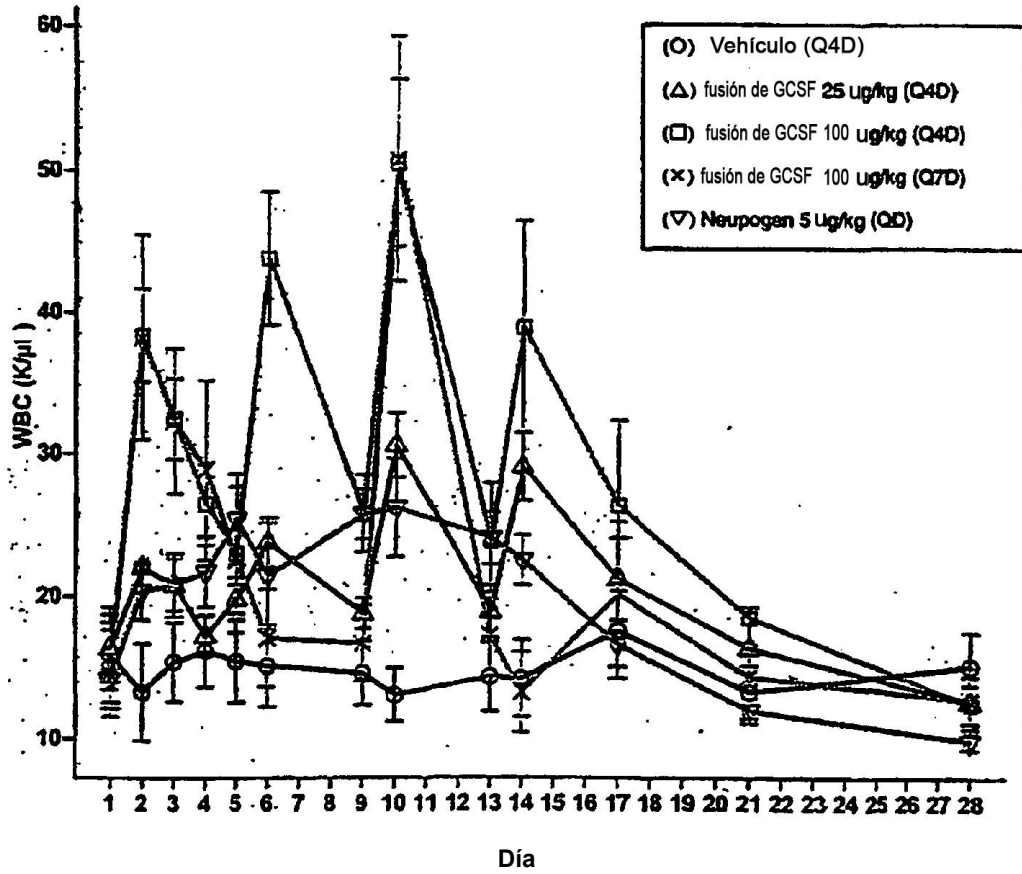


Figura 5