



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 889**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01) **C07K 14/52** (2006.01)
C07K 14/53 (2006.01) **C07K 14/535** (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01) **C07K 14/55** (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01) **C07K 14/56** (2006.01)
C07K 14/565 (2006.01) **C07K 14/57** (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) **C12N 15/12** (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01) **C12N 15/19** (2006.01)
C12N 15/20 (2006.01) **C12N 15/21** (2006.01)
C12N 15/22 (2006.01) **C12N 15/23** (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01) **C12N 15/26** (2006.01)
C12N 15/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98933337 .2**

86 Fecha de presentación : **13.07.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1012184**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**

54

Título: **Derivados de la hormona de crecimiento y proteínas relacionadas.**

30

Prioridad: **14.07.1997 US 52516 P**

73

Titular/es: **Bolder Biotechnology, Inc.**
678 West Willow Street
Louisville, Colorado 80027, US

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

72

Inventor/es: **Cox, George, N., III**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 297 889 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

Derivados de la hormona de crecimiento y proteínas relacionadas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas terapéuticas producidas mediante ingeniería genética. De modo más específico, las proteínas producidas mediante ingeniería genética incluyen la hormona de crecimiento y proteínas relacionadas.

10 **Antecedentes de la invención**

Las siguientes proteínas son codificadas por genes que pertenecen a la superfamilia génica de la hormona de crecimiento (GH por sus siglas en inglés) (Bazan (1990); Mott y Campbell (1995); Silvennoinen y Ihle (1996)): hormona de crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), interleucina-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (subunidad p53), IL-13, IL-15, oncostatina M, factor neurotrófico ciliar, factor inhibitorio de leucemia, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón omega, interferón tau, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), y cardiotrofina-1 (CT-1) (“la superfamilia génica de la GH”). Se anticipa que se identificarán miembros adicionales de esta familia génica en el futuro, mediante la clonación y la secuenciación de genes. Los miembros de la superfamilia génica de la GH poseen estructuras secundarias y terciarias similares, a pesar del hecho de que, por lo general, poseen limitada identidad de secuencia aminoacídica o de ADN. Las características estructurales compartidas permiten que los nuevos miembros de la familia génica puedan identificarse fácilmente.

Existe considerable interés de parte de los pacientes y los proveedores de servicios de salud por el desarrollo de terapéuticas proteicas “amigables para el usuario” de acción a largo plazo. Las proteínas son costosas de fabricar y, a diferencia de los fármacos convencionales de moléculas pequeñas, el organismo no las absorbe fácilmente. Además, se digieren al ser tomadas por vía oral. Por tanto, las proteínas naturales deben administrarse por vía inyectable. Luego de la inyección, la mayoría de las proteínas se eliminan rápidamente del organismo, con la necesidad de inyecciones frecuentes, muchas veces, diarias. A los pacientes les desagradan las inyecciones, lo que tiene como consecuencia una reducida eficacia de la droga y una reducida satisfacción. Algunas proteínas, tales como la eritropoyetina (EPO), son efectivas cuando se administran con menos frecuencia (tres veces por semana para la EPO) porque se encuentran glicosiladas. Sin embargo, las proteínas glicosiladas se producen empleando sistemas de expresión de células de mamíferos que resultan costosos.

El lapso de tiempo que una proteína inyectada permanece en el organismo es finito y se encuentra determinado mediante, p. e., el tamaño de la proteína y si la proteína contiene o no modificaciones covalentes, tales como glicosilación. Las concentraciones circulantes de las proteínas inyectadas cambian constantemente, frecuentemente, en varios órdenes de magnitud, en el transcurso de un período de 24 horas. Concentraciones de agonistas proteicos con cambios constantes pueden tener consecuencias dramáticas en puntos más adelantados de la cadena, a veces pueden disminuir la estimulación y otras incrementar la estimulación de las células blanco. Los antagonistas proteicos poseen problemas similares. Estas fluctuaciones pueden conducir a una disminución de la eficacia y un incremento de la frecuencia de los efectos colaterales adversos de las terapéuticas proteicas. La remoción rápida de las proteínas recombinantes del organismo incrementa de modo significativo la cantidad de proteínas requeridas por paciente e incrementa de manera dramática el costo del tratamiento. Se espera que el costo de los fármacos proteicos humanos se incremente de manera dramática en los próximos años, a medida que se aprueben fármacos nuevos y existentes para más prescripciones a enfermedades.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar tecnologías de liberación de proteínas que disminuyan los costos de la terapéutica proteica para los pacientes y los proveedores de servicios de salud. La presente invención proporciona una solución a este problema, al proporcionar métodos que prolongan los tiempos de vida media de circulación en el organismo de la terapéutica proteica, de manera que las proteínas no deban ser inyectadas frecuentemente. Esta solución también satisface las necesidades y deseos de los pacientes de que la terapéutica proteica sea “amigable para el usuario” o sea, una terapéutica proteica que no requiera inyecciones frecuentes. La presente invención soluciona éstos y otros problemas, al proporcionar variantes de miembros de la superfamilia génica de la hormona de crecimiento que poseen una cisteína añadida y que son biológicamente activos. La invención también proporciona la modificación química de estas variantes con polímeros reactivos a cisteína u otros tipos de restos reactivos a cisteína, para producir derivados de las mismas, y las moléculas así producidas.

60 **Sumario de la invención**

El primer aspecto de la invención proporciona variantes con cisteína de la hormona de crecimiento (ID. SEC. NO:1) que posee la capacidad de provocar la proliferación *in vitro* de una línea celular que prolifera en respuesta a la hormona de crecimiento. Las variantes constan de las cuatro cisteínas nativas C53, C165, C182 y C189 y consta también de un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido que se selecciona a partir del grupo que consta de: un aminoácido localizado en el extremo del terminal N del lazo A-B que corresponde a los aminoácidos 34-52 de la ID. SEC. NO:1, un aminoácido localizado en el lazo B-C, un aminoácido localizado en el lazo C-D, un aminoácido localizado entre

ES 2 297 889 T3

los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice A, un aminoácido localizado entre los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice B, un aminoácido localizado entre los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice C, un aminoácido localizado entre los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice D, un aminoácido localizado entre los aminoácidos que anteceden a la hélice A, y un aminoácido localizado entre los aminoácidos que siguen a la hélice D.

De preferencia, la variante de cisteína consta de un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado del grupo que consta de: F1, T3, P5, E33, A34, K38, E39, Q40, S43, Q46, N47, P48, Q49, T50, S51, A98, N99, S100, G104, A105, S106, E129, D130, G131, S132, P133, T135, G136, Q137, K140, Q141, T142, S144, K145, D147, T148, N149, S150, H151, N152, D153, S184, E186, G187, S188, y G190.

La variante de cisteína puede ser una en que la cisteína sustituida se modifica con un resto reactivo a la cisteína. La variante de cisteína puede modificarse mediante polietilenglicol (PEG), por ejemplo, mediante la modificación del residuo de cisteína sustituido con PEG.

Un segundo aspecto de la invención proporciona una variante de cisteína del primer aspecto de la invención para su empleo en la medicina.

Un tercer aspecto de la invención proporciona el empleo de la variante de cisteína del primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para la estimulación del metabolismo del hueso, el cartílago o el músculo, la estimulación del crecimiento somático durante la infancia, el tratamiento de la estatura pequeña que es resultado de una inadecuación de la hormona de crecimiento y el fallo renal en niños, o el tratamiento de la caquexia en pacientes de SIDA o la caquexia asociada a otras enfermedades.

De manera similar, la presente solicitud muestra variantes de cisteína de miembros de la superfamilia génica. Las variantes constan de un residuo de cisteína que reemplaza a un aminoácido no esencial de las proteínas. De preferencia, las variantes constan de un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado a partir de los aminoácidos en las regiones de los lazos, el final de las hélices alfa, en posición próxima a la primera hélice anfipática, y en posición distal a la última hélice anfipática, o donde el residuo de cisteína se añade hacia el Terminal N o el Terminal C de las proteínas. Los sitios preferidos para la sustitución son los sitios de glicosilación N- y O- ligados.

También se presentan variantes de cisteína en las que el aminoácido que se sustituye se encuentra en los lazos A-B, B-C, el lazo C-D o el lazo D-E de los miembros de tipo interferón/similares al interferón 10 de la superfamilia génica de la GH.

También se presentan variantes de cisteína de miembros de la superfamilia génica de la GH, en los que el residuo de cisteína se introduce entre dos aminoácidos en la proteína natural. En particular, el residuo de cisteína se introduce en las regiones de lazo, los extremos de las hélices alfa, próxima con respecto a la primera hélice anfipática o distal con respecto a la última hélice anfipática. Incluso con mayor particularidad, la variante de cisteína se introduce entre dos aminoácidos en un sitio de glicosilación N-O-, o adyacente a un aminoácido en un sitio de glicosilación N- u O-.

Con mayor particularidad, se presentan variantes de cisteínas en las que la región de lazo en la que se introduce la cisteína es el lazo A-B, el lazo B-C, el lazo C-D o el lazo D-E de los miembros de tipo interferón/similares al interferón 10 de la superfamilia génica de la GH.

Dichas sustituciones de cisteínas o mutaciones de inserción pueden incluir también la inserción de uno o más aminoácidos adicionales en los extremos amino terminal o carboxilo terminal de la sustitución o inserción de cisteína.

Otros ejemplos de variantes de cisteína incluyen las variantes de la eritropoyetina. Las variantes de la eritropoyetina incluyen aquellas en las que el aminoácido sustituido se encuentra en el lazo A-B, el lazo B-C, el lazo C-D, los aminoácidos próximos a la hélice A y distal a la hélice D y los extremos N- o Terminal C. Con mayor especificidad aún, las variantes de cisteína de la EPO incluyen moléculas en las que los aminoácidos indicados a continuación poseen una cisteína que los sustituye: serina-126, N24, I25, T26, N38, I39, T40, N83, S84, A1, P2, P3, R4, D8, S9, T27, G28, A30, E31, H32, S34, N36, D43, T44, K45, N47, A50, K52, E55, G57, Q58, G77, Q78, A79, Q86, W88, E89, T107, R110, A111, G113, A114, Q115, K116, E117, A118, S120, P121, P122, D123, A124, A125, A127, A128, T132, K154, T157, G158, E159, A160, T163, G164, D165, R166 y S85.

Los miembros de la superfamilia génica de la GH incluyen la hormona de crecimiento, la prolactina, el lactógeno placentario, la eritropoyetina, la trombopoyetina, la interleucina-2, la interleucina-3, la interleucina-4, la interleucina-5, la interleucina-6, la interleucina-7, la interleucina-9, la interleucina-10, la interleucina-11, la interleucina-12 (subunidad p53), la interleucina-13, la interleucina-15, la oncostatina M, el factor neurotrófico ciliar, el factor inhibidor de leucemia, el interferón alfa, el interferón beta, el interferón gamma, el interferón omega, el interferón tau, el factor estimulador de colonias de granulocitos, el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos, el factor estimulador de colonias de macrófagos, la cardiotrofina-1 y otras proteínas identificadas y clasificadas como miembros de la familia. Las proteínas pueden obtenerse a partir de cualquier especie animal, incluyendo humanos, animales de compañía y animales de granjas.

Otras variaciones y modificaciones a la invención resultarán obvias a los expertos en la técnica, sobre la base de la especificación y las “reglas” presentadas más adelante en el presente documento. Todas éstas se consideran como parte de la invención.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a variantes de cisteína y, entre otras cosas, la conjugación específica al sitio de dichas proteínas con polietilenglicol (PEG) u otras unidades de este tipo. El PEG es un polímero no antigénico, inerte que prolonga de manera significativa el período de tiempo que una proteína se encuentra circulando en el organismo. Esto permite que la proteína sea efectiva por un período de tiempo más prolongado. La modificación covalente de proteínas con PEG ha demostrado ser un método útil para extender la vida media en circulación de las proteínas en el organismo (Abuchowski *et al.*, 1984; Hershfield, 1987; Meyers *et al.*, 1991). La unión covalente del PEG a una proteína incrementa el tamaño efectivo de la proteína y reduce su velocidad de aclaración del organismo. Los PEGs se encuentran disponibles de forma comercial en diferentes tamaños, lo que permite ajustar a la medida la vida media circulante de las proteínas modificadas con PEG para prescripciones individuales mediante el uso de PEGs de diferentes tamaños. Otros beneficios de la modificación con PEG incluyen un incremento de la solubilidad de la proteína, un incremento de la estabilidad de la proteína *in vivo* y una disminución de la inmunogenicidad de la proteína (Katre *et al.*, 1987; Katre, 1990).

El método preferido para la PEG-ilación de las proteínas es la unión covalente de PEG a residuos de cisteína, empleando PEGs reactivos a cisteína. Una variedad de PEGs reactivos a cisteína de elevada especificidad con diferentes grupos reactivos (p.e., maleímida, vinilsulfonato) y PEGs de distintos tamaños (2-20 kDa) se encuentran disponibles comercialmente (p.e., por parte de Shearwater, Polymers, Inc., Hunstville, AL). A pH neutro, estos reactivos de PEG se unen de manera selectiva a residuos de cisteína “libres”, o sea, residuos de cisteína que no se encuentran involucrados en enlaces disulfuro. Los conjugados son estables a la hidrólisis. El empleo de PEGs reactivos a cisteína permite el desarrollo de conjugados homogéneos PEG-proteína, de estructura definida.

Se ha producido un progreso considerable en años recientes en la determinación de las estructuras de proteínas terapéuticas de importancia comercial y en la comprensión de cómo interactúan con sus blancos proteicos, p.e., receptores de la superficie celular, proteasas, etc. Esta información estructural puede emplearse para diseñar conjugados PEG-proteína empleando PEGs reactivos a cisteína. Los residuos de cisteína en la mayoría de las proteínas participan en enlaces disulfuro y no se encuentran disponibles para la PEG-ilación empleando PEGs reactivos a cisteína. Mediante mutagénesis *in vitro* empleando técnicas de ADN recombinante, se pueden introducir residuos adicionales de cisteína en cualquier lugar de la proteína. Las cisteínas añadidas pueden introducirse al inicio de la proteína, al final de la proteína, entre dos aminoácidos de la secuencia proteica o, de preferencia, sustituir a un aminoácido existente en la secuencia proteica. Las cisteínas “libres” recién añadidas pueden servir como sitios para la unión específica de una molécula de PEG empleando PEGs reactivos a cisteína. La cisteína añadida debe exponerse en la superficie de la proteína y ser accesible para la PEG-ilación para que este método resulte exitoso. Si el sitio empleado para introducir un sitio de cisteína añadido no es esencial para la actividad biológica, entonces la proteína PEG-ilada mostrará una bioactividad *in vitro* que será esencialmente la del tipo salvaje (normal). El mayor reto técnico en la PEG-ilación de las proteínas con PEGs reactivos a cisteína es la identificación de regiones expuestas a la superficie, no esenciales, en la proteína blanco, a donde puedan añadirse los residuos de cisteína, o reemplazar aminoácidos existentes, sin pérdida de bioactividad.

Se han descrito variantes con cisteínas añadidas de unas pocas proteínas humanas, y conjugados polímero-PEG de estas proteínas. La patente US 5.206.344 describe variantes de IL-2 con cisteína añadida. Estas variantes de cisteínas añadidas se localizan dentro de los primeros 20 aminoácidos a partir del amino terminal de la cadena polipeptídica de la IL-2 madura. La variante de cisteína preferida se encuentra en la posición 3 de la cadena polipeptídica madura, que corresponde a un residuo de treonina que se encuentra glicosilado por O en la proteína natural. El reemplazo de la treonina por una cisteína en la posición 3 produce una variante de IL-2 que puede ser PEG-ilada con un PEG reactivo a cisteína, y mantener bioactividad *in vitro* total (Goodson y Katre, 1990). Por el contrario, la IL-2 PEG-ilada con PEGs reactivos a lisina muestra una bioactividad *in vitro* reducida (Goodson y Katre, 1990). Los efectos de las sustituciones de cisteína en otras posiciones de la IL-2 no se han reportado.

La patente US 5.166.322 muestra variantes de IL-3 con cisteína añadida. Estas variantes se localizan dentro de los primeros 14 aminoácidos a partir del Terminal N de la secuencia proteica madura. La patente muestra la expresión de las proteínas en bacterias y la modificación covalente de las proteínas con los PEGs reactivos a cisteína. No se proporciona información acerca de si las variantes de IL-3 con cisteína añadida y conjugados de PEG son biológicamente activos. No se han reportado variantes con cisteína añadida en otras posiciones de la cadena polipeptídica.

La solicitud de patente mundial WO9412219 y la solicitud PCT US95/06540 muestran variantes con cisteína añadida del factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I). El IGF-I posee una estructura muy diferente a la de la GH y no es miembro de la superfamilia génica de la GH (Mott y Campbell, 1995). Se han descrito sustituciones de cisteína en muchas posiciones de la proteína IGF-I. Solo algunas de las variantes con cisteína añadida poseen actividad biológica. El sitio preferido para la variante con cisteína añadida es el aminoácido en la posición 69 en la cadena proteica madura. Las sustituciones de cisteína en posiciones cercanas al Terminal N de la proteína (residuos 1-3) producen variantes de IGF-I con actividades biológicas reducidas y enlaces disulfuro inadecuados.

La solicitud de patente WO9422466 muestra dos variantes con cisteína añadida de la proteína 1 de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), que posee una estructura muy diferente a la de la GH y no es miembro de la superfamilia génica de la GH. Las dos variantes mostradas con cisteína añadida de la proteína 1 de unión a IGF se localizan en las posiciones 98 a 101 en la cadena de la proteína madura y se corresponden con residuos de serina que se fosforilan en la proteína natural.

La solicitud de patente US 07/822296 muestra variantes con cisteína añadida de la proteína de unión al factor de necrosis tumoral, que es una forma soluble, truncada del receptor celular del factor de necrosis tumoral. La proteína de unión al factor de necrosis tumoral posee una estructura muy diferente a la de la GH y no es miembro de la superfamilia génica de la GH.

El IGF-I, la proteína de unión 1 al IGF, y la proteína de unión al factor de necrosis tumoral poseen estructuras secundaria y terciaria que son muy diferentes a las de la GH y dichas proteínas no son miembros de la superfamilia génica de la GH. Debido a esto, resulta difícil utilizar la información obtenida a partir de estudios del IGF-I, la proteína 1 de unión al IGF y la proteína de unión al factor de necrosis tumoral para crear variantes con cisteína añadida de miembros de la superfamilia génica de la GH. Los estudios con IL-2 e IL-3 se llevaron a cabo antes de que se conocieran las estructuras de la IL-2 y la IL-3 (McKay, 1992; Bazan, 1992) y antes de que se conociera que dichas proteínas son miembros de la superfamilia génica de la GH. Los experimentos previos encaminados a la identificación de sitios preferidos para la adición de residuos de cisteína a la IL-2 y la IL-3 fueron en gran medida empíricos y se llevaron a cabo con anterioridad a los experimentos que indicaban que los miembros de la superfamilia génica de la GH poseían estructuras secundaria y terciaria similares.

Sobre la base de la información estructural que se encuentra disponible en la actualidad acerca de miembros de la superfamilia génica de la GH, la presente invención proporciona "reglas" para la determinación a priori de cuáles regiones y residuos de aminoácidos de los miembros de la superfamilia génica de la GH pueden emplearse para introducir o sustituir residuos de cisteína sin provocar una pérdida significativa de actividad biológica. Por el contrario de lo que sucede con proteínas naturales, estas variantes con cisteína añadida de miembros de la superfamilia génica de la GH poseerán propiedades novedosas, tales como la capacidad de ser covalentemente modificadas en sitios definidos dentro de la cadena polipeptídica con polímeros reactivos a cisteína, u otros tipos de restos reactivos a cisteína. Las proteínas modificadas covalentemente serán biológicamente activas.

La GH es el miembro mejor estudiado de la superfamilia génica de la GH. La GH es una proteína de 22 kDa, secretada por la glándula pituitaria. La GH estimula el metabolismo del hueso, el cartílago y el músculo, y es la hormona más importante para la estimulación del crecimiento somático durante la infancia. La GH humana recombinante (rhGH) se emplea para el tratamiento de la estatura pequeña que se da como consecuencia de la inadecuación de la GH y el fallo renal en niños. La GH no está glicosilada, y puede producirse en forma totalmente activa en bacterias. La proteína posee una vida media corta *in vivo* y debe administrarse por medio de inyecciones subcutáneas diarias para una máxima efectividad (MacGillivray *et al.*, 1996). La GH humana recombinante (rhGH) se aprobó recientemente para el tratamiento de la caquexia en pacientes de SIDA y se encuentra bajo estudio para el tratamiento de la caquexia asociada a otras enfermedades.

La secuencia de la GH humana es bien conocida (ver, p.e., Martial *et al.* 1979; Goeddel *et al.* 1979 que se incorporan como referencia en el presente documento; ID. SEC. NO: 1). La GH está muy relacionada, en secuencia, con la prolactina y el lactógeno placentario y estas tres proteínas se consideraron, originalmente, como miembros de una pequeña familia génica. La secuencia primaria de la GH se encuentra altamente conservada entre especies animales (Abdel-Meguid *et al.*, 1987), lo que es consistente con la amplia reactividad cruzada entre especies de la proteína. El patrón de plegamiento tridimensional de la GH porcina se ha resuelto mediante cristalografía de rayos X (Abdel-Meguid *et al.*, 1987). La proteína posee una estructura globular compacta, que comprende cuatro tramos de hélices alfa anfipáticas unidas por lazos. La GH humana posee una estructura similar (de Vos *et al.*, 1992). Las cuatro regiones de hélice alfa se denominan A-D, comenzando a partir del Terminal N de la proteína. Las regiones de lazos se denominan según las regiones de hélice alfa que unen, p.e., el lazo A-B une los tramos de hélice alfa A y B. Los lazos A-B y C-D son largos, mientras que el B-C es corto. La GH comprende cuatro residuos de cisteína, todos los cuales participan en enlaces disulfuro. Las asignaciones de los enlaces disulfuro son la cisteína 53 unida a la cisteína 165 y la cisteína 182 unida a la cisteína 189.

La estructura cristalina de la GH unida a su receptor revela que la GH posee dos sitios de unión al receptor y se une a dos moléculas receptoras (Cunningham *et al.*, 1991; de Vos *et al.*, 1992). Los dos sitios de unión al receptor se denominan sitio I y sitio II. El sitio I contiene el extremo carboxilo (C)-terminal de la hélice D y partes de la hélice A y del lazo A-B, mientras que el sitio II contiene la región amino (N)-terminal de la hélice A y una porción de la hélice C. La unión de la GH a su receptor ocurre de manera secuencial, con el sitio I uniéndose primero siempre. Luego el sitio II se une a un segundo receptor de GH, lo que provoca la dimerización y activación de las vías de señalización intracelulares que conducen a las respuestas celulares a la GH. Una muteína de GH en la que se ha mutado el sitio II (una mutación de glicina a arginina en el aminoácido 120) es capaz de unir un único receptor de GH, pero es incapaz de dimerizar los receptores de GH; esta muteína actúa como un antagonista de la GH *in vitro*, presumiblemente mediante la ocupación de los sitios del receptor de la GH sin la activación de las vías de señalización intracelulares (Fuh *et al.*, 1992).

También se han estudiado los roles de las regiones y aminoácidos específicos involucrados en la unión al receptor de la GH y la señalización intracelular, empleando técnicas tales como la mutagénesis, los anticuerpos monoclonales y la digestión proteolítica. Los primeros experimentos de mutagénesis involucraron el reemplazo de dominios enteros de la GH por regiones similares de la proteína muy similar prolactina (Cunningham *et al.*, 1989). Un hallazgo fue que el reemplazo del lazo B-C de la GH por el de la prolactina no afectaba la unión de la proteína GH híbrida a una forma soluble del receptor de la GH, lo que implicaba que el lazo B-C no era esencial para la unión al receptor. La mutagénesis de barrido de alanina (reemplazo de aminoácidos individuales por alanina) identificó 14 aminoácidos que eran esenciales para la bioactividad de la GH (Cunningham y Wells, 1989). Estos aminoácidos se encuentran localizados en las hélices A, B, C y D, y en el lazo A-B y corresponden a los sitios I y II identificados a partir de estudios estructurales. Se determinó que dos residuos de lisina, en las posiciones aminoácidas 41 y 172, K41 y K172, eran componentes esenciales del sitio I de unión al receptor, lo que explica la disminución de la bioactividad que se observa cuando se acetila K172 (Teh y Chapman, 1988). La modificación de K168 también disminuyó de manera significativa la unión del receptor de la GH y la bioactividad (de la Llosa *et al.*, 1985; Martal *et al.*, 1985; Teh y Chapman, 1988). Las regiones de la GH responsables de la unión al receptor de la GH también se han estudiado empleando anticuerpos monoclonales (Cunningham *et al.*, 1989). Se generó una serie de ocho anticuerpos monoclonales contra la GH humana y se analizó su capacidad de neutralizar la actividad de la GH e impedir la unión de la GH a su receptor recombinante soluble. Los últimos estudios permitieron la localización del supuesto sitio de unión de cada anticuerpo monoclonal dentro de la estructura tridimensional de la GH. De interés resultó que los anticuerpos monoclonales 1 y 8 resultaron incapaces de desplazar a la GH de la unión a su receptor. Los sitios de unión de estos anticuerpos monoclonales se localizaban en el lazo B-C (monoclonal número 1) y el extremo del terminal N del lazo A-B (monoclonal número 8). No se estudiaron monoclonales que se unieran específicamente al lazo C-D. Los estudios de anticuerpos monoclonales sugieren que el lazo B-C y el extremo del terminal N del lazo A-B no son esenciales para la unión al receptor. Finalmente, se encontró que la digestión limitada de la GH con tripsina producía un derivado de dos cadenas que mantenía inalterada su actividad (Mills *et al.*, 1980; Li, 1982). Los estudios de mapeo indicaron que la tripsina cortaba y/o eliminaba aminoácidos entre las posiciones 134 y 149, lo que corresponde al lazo C-D. Estos estudios sugieren que el lazo C-D no está involucrado en la unión al receptor o la bioactividad de la GH.

Se ha determinado la estructura de cierto número de citoquinas, incluyendo G-CSF (Hill *et al.*, 1993), GM-CSF (Diederichs *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1992), IL-2 (Bazan, 1992; McKay, 1992), IL-4 (Redfield *et al.*, 1991; Powers *et al.*, 1992), e IL-5 (Milburn *et al.*, 1993) mediante difracción de rayos-X y estudios de RMN, y muestran una conservación asombrosa con la estructura de la GH, a pesar de una carencia de homología significativa en la secuencia primaria. La EPO se considera un miembro de esta familia, sobre la base de estudios de modelación y mutagénesis (Boissel *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 1994). A esta familia pertenecen una gran cantidad de otras citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo el factor ciliar neurotrófico (CNTF), el factor inhibidor de leucemia (LIF), la trombopoyetina (TPO), la oncostatina M, el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), la IL-3, la IL-6, la IL-7, la IL-9, la IL-12, la IL-13, la IL-15, y el interferón alfa, beta, omega, tau y gamma (revisado por Mott y Campbell, 1995; Silvennoinen y Ihle 1996). Todas las citoquinas y factores de crecimiento anteriores se considera que constituyen una única gran familia, de la cual la GH es el prototipo.

Además de compartir estructuras secundaria y terciaria similares, los miembros de esta familia comparten la propiedad de que deben oligomerizar los receptores de la superficie celular para activar las vías de señalización intracelulares. Algunos miembros de la familia de la GH, p.e., la GH y la EPO se unen a un único tipo de receptor y provocan la formación de homodímeros. Otros miembros de la familia, p.e., la IL-2, la IL-4, y la IL-6, se unen a más de un tipo de receptor y provocan que estos receptores formen heterodímeros o agregados de orden superior (Davis *et al.*, 1993; Paonessa *et al.*, 1995; Mott y Campbell, 1995).

Los estudios de mutagénesis han mostrado que, al igual que la GH, estas otras citoquinas y factores de crecimiento contienen múltiples sitios de unión al receptor, por lo regular dos, y se unen a sus receptores de manera secuencial (Mott y Campbell, 1995; Matthews *et al.*, 1996). Al igual que la GH, los sitios primarios de unión al receptor para estos otros miembros de la familia, se encuentran de manera primaria en las cuatro hélices alfa y el lazo A-B (revisado en Mott y Campbell, 1995). Los aminoácidos específicos en los tramos de hélices que participan en la unión al receptor son diferentes entre los miembros de la familia (Mott y Campbell, 1995). La mayoría de los receptores de la superficie celular que interactúan con miembros de la superfamilia génica de la GH están relacionados estructuralmente y contienen una segunda gran familia multigénica (Bazan, 1990; Mott y Campbell, 1995; Silvennoinen y Ihle 1996).

Una conclusión general alcanzada a partir de estudios de mutación de varios miembros de la superfamilia génica de la GH es que los lazos que unen las hélices alfa tienden a no estar involucrados en la unión al receptor. En particular, el lazo corto B-C aparentemente no resulta esencial para la unión al receptor en la mayoría, si no todos, los miembros de la familia. Por esta razón, el lazo B-C es una región preferencial para la introducción de sustituciones de cisteínas en miembros de la superfamilia génica de la GH. El lazo A-B, el lazo B-C, el lazo C-D (y el lazo D-E de los miembros de la superfamilia génica de la GH de tipo interferón/similares a la IL-10) también son sitios preferenciales para la introducción de mutaciones de cisteína. Los aminoácidos situados cerca de la hélice A y distal a la hélice final también tienden a no estar involucrados en la unión al receptor y también son sitios preferenciales para la introducción de las mutaciones de cisteína. Ciertos miembros de la familia de la GH, p.e., EPO, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, G-CSF, GM-CSF, TPO, IL-10, IL-12 p35, IL-13, IL-15 y el interferón beta contienen azúcares Ligados por N u Ligados por O. Los sitios de glicosilación en la proteína se encuentran casi exclusivamente en las regiones de los lazos y no en los tramos de hélices alfa. Dado que las regiones de los lazos en general no están involucradas en la unión al receptor y dado que son sitios para la unión covalente de grupos azúcares, son sitios preferidos para la introducción de sustituciones

de cisteína en las proteínas. Los aminoácidos que contienen los sitios de glicosilación Ligados por N y Ligados por O en las proteínas son sitios preferenciales para la sustitución con cisteínas, porque estos aminoácidos se encuentran expuestos a la superficie, la proteína natural puede tolerar grupos azúcares voluminosos unidos a las proteínas en estos sitios y los sitios de glicosilación tienden a estar alejados de los sitios de unión al receptor.

5

Es muy probable que se descubran muchos otros miembros de la familia génica de la GH en el futuro. Los nuevos miembros de la superfamilia génica de la GH pueden identificarse por medio de análisis de estructura secundaria y terciaria asistidos por computadora, a partir de las secuencias proteicas predichas. Los miembros de la superfamilia génica de la GH poseerán cuatro o cinco hélices anfipáticas unidas por aminoácidos no helicoidales (las regiones de

10

lazos). Las proteínas pueden contener una secuencia señal hidrófoba en su terminal N, que promueva la secreción de la célula.

En este documento se presentan “reglas” para la creación de variantes biológicamente activas, con cisteínas añadidas, de miembros de la superfamilia génica de la GH. Estas “reglas” pueden aplicarse a cualquier miembro existente o futuro de la superfamilia génica de la GH. Las variantes con cisteínas añadidas poseerán propiedades novedosas que no comparten las proteínas naturales. Lo más importante: las variantes con cisteínas añadidas poseerán la propiedad de que pueden ser covalentemente modificadas con polímeros reactivos a cisteína u otros tipos de restos reactivos a cisteína para generar proteínas biológicamente activas con propiedades mejoradas, tales como vida media *in vivo* incrementada, solubilidad incrementada y eficacia mejorada *in vivo*.

20

Las variantes biológicamente activas, con cisteínas añadidas de miembros de la superfamilia génica de la GH pueden prepararse mediante la sustitución de residuos de aminoácidos no esenciales de las proteínas por residuos de cisteína. De preferencia, los residuos de cisteína sustituyen a aminoácidos comprendidos dentro de las regiones de los lazos, a aminoácidos cercanos a los extremos de las hélices alfa y a los aminoácidos próximos a la primera hélice anfipática o distal a la hélice anfipática final de estas proteínas. Otros sitios preferenciales para la adición de residuos de cisteína son los extremos terminal N y terminal C de las proteínas. Los residuos de cisteína también pueden introducirse entre dos aminoácidos en las regiones expuestas de la cadena polipeptídica. Se muestra en este documento que los sitios de glicosilación ligados por N y ligados por O en las proteínas constituyen sitios preferenciales para la introducción de sustituciones de cisteína, ya sea mediante la sustitución de aminoácidos que formen los sitios o, en el caso de sitios ligados por N, mediante la introducción de cisteínas en los mismos. Los sitios de glicosilación pueden ser residuos de serina o treonina que se encuentran glicosilados por O, o residuos de asparagina que se encuentran glicosilados por N. Los sitios de glicosilación ligados por N poseen la estructura general asparagina-X-serina o treonina (N-X-S/T), donde X puede ser cualquier aminoácido. El residuo de asparagina, el aminoácido en la posición X y el residuo de serina/treonina del sitio de glicosilación ligado por N son sitios preferenciales para la creación de variantes de estas proteínas biológicamente activas con sustituciones de cisteína. Los aminoácidos que rodean inmediatamente, o que se encuentran adyacentes a, los sitios de glicosilación ligados por O y ligados por N (en el intervalo de aproximadamente 10 residuos a cada lado del sitios de glicosilación) son sitios preferidos para la introducción de sustituciones de cisteína.

35

Con mayor generalidad, algunas de las “reglas” para la identificación de sitios preferenciales para la creación de variantes proteicas biológicamente activas con cisteínas añadidas, pueden aplicarse a cualquier proteína, no solo a proteínas que sean miembros de la superfamilia génica de la GH. Específicamente, los sitios preferenciales para la creación de variantes de cisteína biológicamente activas de las proteínas (diferentes a la IL-2) son los sitios de glicosilación ligados por O. Los aminoácidos que rodean inmediatamente al sitio de glicosilación ligado por O (dentro de alrededor de 10 residuos a cada lado del sitio de glicosilación) también son sitios preferidos. Los sitios de glicosilación ligados por N, y los residuos de aminoácidos que se encuentran inmediatamente adyacentes a cada lado del sitio de glicosilación (dentro de aproximadamente 10 residuos del sitio N-X-S/T) también son sitios preferenciales para la creación de variantes proteicas con cisteínas añadidas. Dichos aminoácidos no esenciales pueden identificarse por medio de mutagénesis de barrido de cisteína sobre la proteína blanco y la medición de los efectos sobre la actividad biológica. La mutagénesis de barrido de cisteína involucra la adición o sustitución de aminoácidos individuales de la cadena polipeptídica por residuos de cisteína y la determinación de los efectos de la sustitución de cisteína sobre la actividad biológica. La mutagénesis de barrido de cisteína es similar a la mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham *et al.*, 1992), excepto por el hecho de que los aminoácidos individuales se sustituyen por residuos de cisteína, en lugar de alanina.

50

La aplicación de las “reglas” para la creación de variantes con cisteínas añadidas y conjugados de antagonistas de proteínas también se contempla. La producción en exceso de citoquinas y factores de crecimiento se ha implicado en la patología de muchas dolencias inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, el asma, las alergias y la formación de cicatrices en las heridas. La producción excesiva de GH se ha implicado como una causa de acromegalia. Determinados factores de crecimiento y citoquinas, p.e., la GH y la IL-6, se han implicado en la proliferación de cánceres particulares. Muchos de los factores de crecimiento y citoquinas involucrados en la inflamación y el cáncer son miembros de la superfamilia génica de la GH. Existe un interés considerable en el desarrollo de antagonistas proteicos de estas moléculas, para el tratamiento de estas enfermedades. Una estrategia involucra la modificación de las citoquinas y los factores de crecimiento, de manera que puedan unirse a los receptores, pero no oligomerizarlos. Esto se logra mediante mutagénesis del segundo sitio de unión al receptor (sitio II) de las moléculas. Las luteínas resultantes son capaces de unirse al receptor y ocupar sus sitios, pero son incapaces de activar las vías de señalización intracelulares. Esta estrategia se ha aplicado con éxito para la GH, para construir un antagonista de la GH (Cunningham *et al.*, 1992). Se han desarrollado estrategias similares para el desarrollo de antagonistas de otros miembros de la superfamilia génica de la GH, tales como la IL-2 (Zurawski *et al.*, 1990; Zurawski y Zurawski, 1992), la IL-4 (Kruse *et al.*,

65

1992), la IL-5 (Tavernier *et al.*, 1995), el GMCSF (Hercus *et al.*, 1994) y la EPO (Matthews *et al.*, 1996). Dado que los sitios preferenciales para la adición de residuos de cisteína a los miembros de la superfamilia génica de la GH descritos aquí se encuentran situados fuera de los sitios de unión al receptor de estas proteínas y, por tanto, fuera de cualquier sitio empleado para la creación de antagonistas proteicos, las variantes de cisteínas añadidas descritas en este documento pueden emplearse para generar versiones de acción a largo plazo de antagonistas proteicos. Como ejemplo, Cunningham *et al.* (1992) desarrollaron un antagonista *in vitro* de la GH mediante la mutación de un residuo de glicina (aminoácido 120) a una arginina. Este residuo de lisina es un componente esencial del segundo sitio de unión al receptor en la GH; al remplazársele por arginina, la GH no puede dimerizar los receptores. La mutación de glicina a arginina en la posición 120 puede introducirse en las secuencias de ADN que codifican para las variantes con cisteína añadida de la GH, que se contemplan en este documento, para crear un antagonista de la GH con cisteína añadida que puede conjugarse con PEGs reactivos a cisteína, u otros tipos de restos reactivos a cisteína. De manera similar, cambios en aminoácidos en otras proteínas que convierten las proteínas de agonistas a antagonistas pueden incorporarse a las secuencias de ADN que codifican las variantes proteicas con cisteínas añadidas que se describen en este documento. Se está dedicando un esfuerzo considerable a la identificación de cambios de aminoácidos que conviertan las proteínas de agonistas a antagonistas. Hercus *et al.* (1994) reportaron que la sustitución del ácido glutámico en la posición 21 de la proteína GM-CSF madura por arginina o lisina convierte a la GM-CSF de agonista a antagonista. Tavernier *et al.* (1995) reportó que la sustitución del ácido glutámico en la posición 13 de la IL-5 madura por glutamina crea un antagonista de la IL-5.

Estrategias experimentales similares a las descritas con anterioridad pueden emplearse para crear variantes con cisteínas añadidas (tanto agonistas como antagonistas) de miembros de la superfamilia génica de la GH obtenidos a partir de varios animales. Esto es posible porque la secuencia aminoácídica primaria y las estructuras de las citoquinas y los factores de crecimiento se encuentran extremadamente bien conservadas entre los humanos y especies animales. Por esta razón, las “reglas” presentadas en este documento para la creación de variantes biológicamente activas, con cisteínas añadidas, de miembros de la superfamilia génica de la GH serán útiles para la creación de variantes biológicamente activas, con cisteínas añadidas, de miembros de la superfamilia génica de la GH de especies de animales de compañía (p.e., perros, gatos, caballos) y animales comerciales (p.e., vacas, ovejas, cerdos). La conjugación de estas variantes con cisteínas añadidas a PEGs reactivos a cisteína creará versiones de acción larga de estas proteínas que beneficiarán al animal de compañía y los mercados de animales comerciales de granjas.

Las proteínas que son miembros de la superfamilia génica de la GH (citoquinas hematopoyéticas) son proporcionadas por Silvennoimem e Ihle (1996). Silvennoimem e Ihle (1996) también proporcionan información acerca de la estructura y la expresión de estas proteínas. Las secuencias de ADN, los aminoácidos codificados y los ensayos biológicos llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* para las proteínas descritas en este documento se describen en Aggarwal y Gurterman (1992; 1996), Aggarwal (1998), y Silvennoimem e Ihle (1996). Los ensayos biológicos para las proteínas también son proporcionados por catálogos de varios suministradores comerciales de dichas proteínas, tales como R&D Systems, Inc. y Endogen, Inc.

El siguiente ejemplo se proporciona para demostrar de qué modo estas “reglas” pueden emplearse para la creación de variantes de la GH con cisteínas añadidas. El ejemplo no pretende ser limitante, sino solamente ejemplificar realizaciones específicas de la invención.

Ejemplo 1

45 Variantes de la GH con cisteína añadida

Este ejemplo expone ciertos aminoácidos en la GH que no son esenciales para la actividad biológica y que, mutados a residuos de cisteína, no alterarán el patrón normal de enlace disulfuro y la conformación general de la molécula. Estos aminoácidos están situados en el extremo del terminal N del lazo A-B (aminoácidos 34-52 de la secuencia de la proteína madura; SEC ID No: 1; Martial *et al* 1979; Goeddel *et al* 1979), el lazo B-C (aminoácidos 97-105 en la secuencia de la proteína madura) y el lazo C-D (aminoácidos 130-153 en la secuencia de la proteína madura). Los tres primeros o tres últimos aminoácidos en las hélices A, B, C y D y los aminoácidos próximos a la hélice A y distales a la hélice D también se identifican como sitios preferidos para la introducción de residuos de cisteína.

Las secuencias de ADN que codifican para la GH salvaje pueden amplificarse utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADNc de simple cadena disponible comercialmente preparado a partir de pituitarias humanas (ClonTech, San Diego, CA) o ensamblados utilizando oligonucleótidos superpuestos. Las mutaciones específicas pueden introducirse en la secuencia de la GH utilizando una variedad de procedimientos tales como técnicas de fagos (Kunkel *et al* 1987), técnicas de mutagénesis PCR (Innis *et al* 1990; White 1993), paquetes de mutagénesis tales como los vendidos por Stratagene (“Quick-Change Mutagenesis” kit, San Diego, CA) o Promega (Gene Editor Kit, Madison WI).

Las sustituciones de cisteína pueden introducirse en cualquiera de los aminoácidos que forman el lazo B-C, el lazo C-D y el extremo del terminal N del lazo A-B o en los tres primeros aminoácidos de las regiones alfa helicoidales que colindan con estas regiones o en la región próxima a la hélice A o distal a la hélice D. Los sitios preferidos para la introducción de residuos de cisteína son: F1, T3, P5, E33, A34, K38, E39, Q40, S43, Q46, N47, P48, Q49, T50, S51, S55, T60, A98, N99, S100, G104, A105, S106, E129, D130, G131, S132, P133, T135, G136, Q137, K140, Q141, T142, S144, K145, D147, T148, N149, S150, H151, N152, D153, S184, E186, G187, S188, y G190. Los residuos

ES 2 297 889 T3

de cisteína también pueden introducirse al comienzo de la proteína madura, i.e., próximos al aminoácido F1, o luego del último aminoácido en la proteína madura, i.e., después del F191. Si se desea, pueden combinarse fácilmente dos o más mutaciones en la misma proteína, ya sea por recombinación *in vitro* de ADN de genes mutantes clonados y/o construcción secuencial de mutaciones individuales deseadas.

5

1. Clonación del gen de la hormona de crecimiento humana (GH)

El gen de la GH humana se amplificó a partir de ADNc de simple cadena de pituitaria humana (disponible comercialmente en CLONTECH, Inc., Palo Alto, CA) utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los cebadores BB1 y BB2. La secuencia de BB1 es 5'-GGGGGTCGACCATATGTTCCCAACCATTCCTTATCCAG-3' (SEC ID NO: 24). La secuencia de BB2 es 5'-GGGGGATCCTCACTAGAAGCCACAGCTGCCCTC-3' (SEC ID NO: 25). El cebador BB1 se diseñó para codificar una metionina iniciadora precediendo al primer aminoácido de la GH madura, fenilalanina, y sitios *Sall* y *NdeI* con propósitos de clonación. El cebador inverso BB2 contiene un sitio *BamHI* con objetivos de clonación. Las reacciones de PCR de 100 microlitros contenían 20 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, tampón de PCR 1X (tampón Perkin-Elmer que contenía MgCl₂), concentración micromolar 200 de cada uno de los cuatro nucleótidos dA, dC, dG y dT, 2 ng de ADNc de cadena simple, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Perkin-Elmer) y 2,5 unidades de polimerasa Pfu (Stratagene, Inc.). Las condiciones de la reacción de PCR fueron de 96°C durante 3 minutos, 35 ciclos de (95°C, 1 minuto; 63°C, 30 segundos; 72°C, un minuto), seguidos de 10 minutos a 72°C. El equipo para el ciclado térmico empleado fue el Amplitron II Thermal Cycler (Thermolyne). El producto de PCR de aproximadamente 600 p.b. fue digerido con *Sall* y *BamHI*, purificado con gel y clonado en el plásmido pUC19 digerido de manera similar (disponible comercialmente en New England BioLabs, Beverly, MA). La mezcla ligada se transformó en una cepa de *E. coli* DH5alfa y los transformantes se seleccionaron en placas LB que contenían ampicilina. Se desarrollaron varias colonias en el transcurso de la noche en medio LB y ADN plasmídico aislado utilizando paquetes de aislamiento de ADN miniplasmídico comprados a Qiagen, Inc (Valencia, CA). Se determinó que el clon LB6 tenía la secuencia de ADN correcta.

Para la expresión en *E. coli*, se digirió el clon LB6 con *NdeI* y *EcoRI*, se purificó en gel el fragmento de aproximadamente 600 p.b. y se clonó en el plásmido pCYB1 (disponible comercialmente a partir de New England BioLabs, Beverly, MA) que había sido digerido con la misma enzima, y desfosfatado. La reacción de ligación se transformó en *E. coli* DH5alfa y se seleccionaron los transformantes en placas de LB con ampicilina. El ADN plasmídico se aisló a partir de varios transformantes, y se muestreó mediante digestión con *NdeI* y *EcoRI*. Se identificó un clon correcto, y se le dio el nombre pCYB1: GHs (pBBT120). Este plásmido se transformó en cepas de *E. coli* JM109 o W3110 (disponible comercialmente a partir de New England BioLabs y la American Type Culture Collection).

2. Construcción de STII-GH

El clon LB6 de GH de tipo salvaje (pUC19: GH tipo salvaje) se empleó como molde para construir un clon de GH contentivo de la secuencia señalizadora STII *E. coli* (Picken *et. al.* 1983). Debido a su extensión, la secuencia STII se añadió en dos reacciones PCR secuenciales. La primera reacción utilizó el cebador directo BB12 y el cebador inverso BB10. El BB10 tenía la secuencia: 5'CGCGGATCCGATTAGAAATCCACAGCTCCCCTC3' (SEC ID NO: 28). El BB 112 tenía la secuencia: 5'ATCTATGTTTCGTTTCTCTATCGCTACCAACGCTTACGCATTCCCAAC CATTCCCTTATCCAG-3' (SEC ID NO: 30).

Las reacciones de PCR fueron tal como se describió para amplificar la GH de tipo salvaje, excepto en que se utilizaron aproximadamente 4 ng de plásmido LB6 como molde en lugar de ADNc de simple cadena y las condiciones del PCR fueron 96°C durante 3 minutos, 30 ciclos de (95°C durante 1 minuto; 63°C durante 30 segundos; 72°C durante 1 minuto) seguido de 72°C durante 10 minutos. El producto de PCR de aproximadamente 630 p.b. se purificó en gel utilizando el paquete Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc), diluido en agua en proporción de 50 veces y 2 microlitros utilizados como molde para la segunda reacción de PCR. La segunda reacción de PCR utilizó el cebador inverso BB10 y el cebador directo BB11. El BB11 tiene la secuencia: 5'CCCCCTTAGACATATGAAGAAGAACATCG CATTCTGCTGGCATCTATGTTTCGTTTCTCTATCG-3' (SEC ID NO: 29).

El cebador BB11 contiene sitios *XbaI* y *NdeI* con objetivos de clonación. Las condiciones de PCR fueron tal como se describieron en la primera reacción. El producto de PCR de aproximadamente 660 p.b. se digirió con *XbaI* y *BamHI*, se purificó en gel y se clonó en el plásmido pADNC3.1(+) cortado de manera similar (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). El clon pADNC3.1(+):stII-GH(5C) o "5C" se determinó que tenía la secuencia de ADN correcta.

El clon "5C" fue escindido con *NdeI* y *BamHI* y clonado a pBBT108 con corte similar (un derivado de pUC19 que carece de un sitio *Pst I*, este plásmido se describe más adelante). Se identificó un clon con el inserto correcto siguiendo la digestión con estas enzimas. Este clon, designado pBBT111, se digirió con *NdeI* y *Sall*, el fragmento de 660 p.b. contentivo del gen de fusión stII-GH, se purificó en gel y se clonó al vector plasmídico de expresión pCYB (New England BioLabs) que había sido digerido con las mismas enzimas y fosfatado. Se identificó un plásmido recombinante contentivo de la inserción stII-GH mediante digestiones de restricción de endonucleasas. Se eligió un aislamiento del mismo para estudios posteriores y se le designó como pBBT114. Este plásmido se transformó en cepas *E. coli* JM109 o W3110 (disponibles en New England BioLabs y la American Type Culture Collection).

3. Construcción de ompA-GH

El clon LB6 de la GH de tipo salvaje (pUC19: GH de tipo salvaje) se utilizó como molde para construir un clon de GH contentivo de la secuencia señalizadora de *E. coli* ompA (Mowa *et al.* 1980). Debido a su extensión, la secuencia ompA se añadió en dos reacciones PCR secuenciales. La primera reacción utilizó el cebador directo BB7: 5'GCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCTTCCCAACCATTCCC TTATCCAG 3' (SEC ID NO: 31), y el cebador inverso BB10: 5' CGCGGATCCGATTAGAAATCCACAGCTCCCCTC 3' (SEC ID NO: 28).

Las reacciones de PCR fueron tal como se describió para la amplificación de la GH de tipo salvaje excepto que aproximadamente 4 ng del plásmido LB6 se utilizaron como molde en lugar del ADNc de simple cadena y las condiciones del PCR fueron 96°C durante 3 minutos, 30 ciclos de (95°C durante 1 minuto; 63°C durante 30 segundos; 72°C durante 1 minuto) seguido de 72°C durante 10 minutos. El producto de PCR de aproximadamente 630 p.b. se purificó en gel utilizando el paquete Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc), se diluyó en proporción 50 veces en agua y se emplearon 2 microlitros como patrón para la segunda reacción de PCR. La segunda reacción de PCR utilizó el cebador inverso BB10 y el cebador directo BB6: 5'CCCCGTGACACATATGAAGAAGACAGCTATCGCGATTG CAGTGGCACTGGCTGGTTTC 3' (SEC ID NO: 32).

Las condiciones del PCR fueron tal como se describió en la primera reacción. El producto de PCR de aproximadamente 660 p.b. se purificó con gel, se digirió con *Sal* I y *Bam* H1 y se clonó en pUC19 (New England BioLabs) que se cortó con *Sal* I y *Bam* H1 o pADNC3.1(+) (Invitrogen) que había sido cortado con *Xho* I y *Bam* H1 (*Sal* I y *Xho* I producen salientes compatibles de simple cadena). Cuando se secuenciaron varios clones, se descubrió que todos los clones pUC19 (8/8) contenían errores en la región de la secuencia ompA. Sólo se secuenció un clon pCADN3.1(+) y contenía una ambigüedad secuencial en la región ompA. Para generar una fusión correcta ompA-GH se recombinaron y clonaron al derivado pUC19 que carece del sitio *Pst* I (véase pBBT108 descrito más adelante) segmentos de genes de dos clones secuenciados que contenían diferentes errores separados mediante una restricción conveniente. El plásmido resultante, denominado pBBT112, porta el gen fusionado ompA-GH, clonado como un fragmento *Nde* I - *Bam* H1 en estos mismos sitios en pBBT108. Este plásmido se designó como pBBT112 y se utiliza en la mutagénesis específica al sitio de la GH, basada en PCR, tal como se describe más adelante.

4. Construcción de Pst-pUC19

Para facilitar la mutagénesis del gen de GH clonado para la construcción de la sustitución de la cisteína elegida y de las mutaciones de inserción se construyó, como sigue, un derivado del plásmido pUC19 (New England BioLabs) carente de un sitio *Pst* I. Se digirió el ADN del plásmido pUC19 con *Pst* I y a continuación se trató a 75°C con ADN Polimerasa PFU (Stratagene) utilizando el tampón de reacción suministrado por el vendedor, suplementado con 200uM dNTPs. Bajo estas condiciones, la polimerasa digerirá el saliente de 3' de simple cadena creado por la digestión de *Pst* I, pero no digerirá la región de doble cadena. El resultado neto será la eliminación de las cuatro bases de simple cadena que comprenden las cuatro bases del medio del sitio de reconocimiento de *Pst* I. La molécula resultante tiene extremos de doble cadena, o sea, "romos". A continuación de estas reacciones enzimáticas, el monómero lineal se purificó en gel utilizando el paquete Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc.) Este ADN purificado se trató con ADN Ligasa T4 (New England BioLabs) en correspondencia con los protocolos del vendedor, se digirió con *Pst* I y se utilizó para transformar *E. coli* DH5alfa. Los transformantes se eligieron y analizaron mediante digestión de restricción con *Pst* I y *Bam* H1. Uno de los transformantes que no estaba escindido por *Pst* I pero sí lo estaba en el sitio cercano de *Bam* H1, se eligió y designó como pBBT108.

5. Construcción de muteínas de GH

Las muteínas de GH se construyeron generalmente utilizando la mutagénesis dirigida basada en PCR tal como se describe en los protocolos de PCR: Current Methods y Applications editados por B. A. White, 1993 Humana Press, Inc., Totowa, NJ y los Protocolos de PCR: A Guide to Methods y Applications editados por Innis, M. A. *et al.* 1990 Academic Press Inc San Diego, CA. Por lo regular, se diseñan oligonucleótidos cebadores de PCR para incorporar cambios nucleotídicos a la secuencia de codificación de la GH que resultan en la sustitución de un aminoácido por un residuo de cisteína en una posición específica dentro de la proteína. Dichos oligonucleótidos cebadores mutagénicos pueden también diseñarse para incorporar un residuo de cisteína adicional en el extremo carboxi terminal o en el extremo amino terminal de la secuencia codificadora de la GH. En este último caso uno o más residuos adicionales de aminoácidos pudieran incorporarse también en el amino terminal y/o carboxi terminal al residuo añadido de cisteína si fuera deseable. Es más, los oligonucleótidos pueden ser diseñados para incorporar residuos de cisteína como mutaciones de inserción en posiciones específicas dentro de la secuencia de codificación de la GH si fuera deseable. De nuevo, uno o más aminoácidos adicionales pueden ser insertados conjuntamente con el residuo de cisteína y estos aminoácidos pudieran estar ubicados hacia el amino terminal y/o carboxi terminal al residuo de cisteína.

La mutación de sustitución de cisteína T135C se construyó como sigue. El oligonucleótido inverso mutagénico BB28: 5'CTGCTTGAAGATCTGCCACACCGGGGGCTGCCATC3' (SEC ID NO: 33) se diseñó para cambiar el codón ACT para treonina en el residuo aminoácido 135 a un codón TGT que codifica para cisteína y para extenderse sobre el sitio cercano *Bgl* II. Este oligonucleótido se utilizó en el PCR conjuntamente con el oligonucleótido directo BB34: 5'GTAGCGCAGGCCTTCCCAACCATT3' (SEC ID NO: 34) que hibridiza en la región de unión de la fusión ompA-GH y no es mutagénico. El PCR se llevó a cabo en una reacción de 50ul en tampón de PCR 1X (tampón Perkin-Elmer contentivo de 1,5 mM MgCl₂), concentración 200 micromolar de cada uno de los cuatro nucleótidos

ES 2 297 889 T3

dA, dC, dG y dT, con cada cebador oligonucleotídico presente a 0,5 μ M, 5 pg de pBBT112 (antes descrito) como molde y 1,25 unidades de Polimerasa de ADN Amplitac (Perkin-Elmer) y 0,125 unidades de Polimerasa de ADN PFU (Stratagene). Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo para el ciclado térmico Robocycler Gradient 96 (Stratagene). El programa utilizado incluía: 95°C durante 3 minutos seguido de 25 ciclos de 95°C durante 60 segundos, 45°C o 50°C o 55°C durante 75 segundos, 72°C durante 60 segundos seguido de una espera a 6°C. Las reacciones de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para identificar temperaturas de unión que aportaran suficiente producto del tamaño esperado; aproximadamente 430 pb. La reacción 45°C fue “limpiada” utilizando el paquete QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), y digerida con *Bgl* II y *Pst* I. El fragmento de 278 p.b. *Bgl* II-*Pst* I resultante, que incluye la mutación T135C putativa, se purificó en gel y ligó a pBBT111 el derivativo pUC19 portando el gen de fusión stII-GH (antes descrito) que había sido digerido con *Bgl* II y *Pst* I y purificado con gel. Los transformantes de esta ligación se seleccionaron inicialmente por digestión con *Bgl* II y *Pst* I y seguidamente se secuenció un clon para confirmar la presencia de la mutación T135C y la ausencia de cualquier mutación adicional que pudiera introducirse potencialmente por la reacción de PCR o por los oligonucleótidos sintéticos. Se verificó que el clon secuenciado tenía la secuencia correcta.

La mutación de sustitución S132C se construyó utilizando el protocolo descrito anteriormente para T135C con las siguientes diferencias: se utilizó el oligonucleótido mutagénico inverso BB29 5'CTGCTTGAAGATCTGCCAGTCCGGGGCAGCCATCTTC3' (SEC ID NO: 35) en lugar del BB28 y la reacción de PCR con temperatura de unión de 50°C se utilizó para la clonación. Se encontró que uno de los dos clones secuenciados tenía la secuencia correcta.

La mutación de sustitución T148C se construyó utilizando un protocolo análogo pero empleando una estrategia de clonación diferente. El oligonucleótido mutagénico directo BB30 5'GGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACTGCAACTCACACAAC3' (SEC ID NO: 36) se utilizó en el PCR con el cebador inverso no mutagénico BB33 5'CGCGGTACCCGGGATCCGATTAGAATCCACAGCT3' (SEC ID NO: 37) que hibridiza con el extremo 3' de la secuencia codificante de la GH y expande el sitio *Bam* HI inmediatamente en dirección hacia abajo. Se llevó a cabo el PCR como se describió anteriormente con la excepción de que las temperaturas de unión utilizadas fueron de 46,51 y 56°C. Luego de los análisis de PCR y de gel tal como se describiera anteriormente las reacciones de 46 y 51°C se tomaron alcuotas para la clonación. Estas se digirieron con *Bam* HI y *Bgl* II, se purificaron en gel y se clonaron en pBBT111 que se había digerido con *Bam* HI y *Bgl* II tratado con fosfatasa alcalina intestinal vacuna (Promega) en correspondencia con los protocolos del vendedor, y se purificaron en gel. Los transformantes de esta ligación se analizaron mediante digestión con *Bam* HI y *Bgl* II para identificar clones en los cuales el fragmento mutagénico de PCR de 188 p.b. *Bam* HI-*Bgl* II se clonara en la orientación apropiada. Debido a que *Bam* HI y *Bgl* II generan extremos compatibles, este paso de clonación no tiene especificidad de orientación. Se mostró que cinco o seis clones puestos a prueba estaban orientados correctamente. Uno de estos se secuenció y se mostró que contenía la mutación T148C deseada. La secuencia del resto del fragmento mutagénico de PCR de 188 p.b. *Bam* HI-*Bgl* II en este clon se confirmó como correcta.

La construcción de la mutación de sustitución S144C fue idéntica a la construcción de la T148C con las siguientes excepciones. El oligonucleótido directo mutagénico BB31 5'GGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACTGCAAGTTCGAC3' (SEC ID NO: 38) se utilizó en lugar del BB30. Dos de los seis clones puestos a prueba se mostró que tenían orientación correcta. Uno de estos se secuenció y se mostró que contenía la mutación S144C deseada. La secuencia del resto del fragmento mutagénico de PCR de 188 p.b. *Bam* HI-*Bgl* II en este clon se confirmó como correcta.

También se construyó una mutación que añadía un residuo de cisteína al carboxilo terminal natural de la GH. La construcción de esta mutación, designada stp192C, fue similar a la del T148C, pero empleaba cebadores oligonucleotídicos diferentes. El oligonucleótido mutagénico inverso BB32 5'CGCGGTACCCGGATCCTTAGCAGAAGCCACAGCTGCCCTCCAC3' (SEC ID NO: 39) que inserta un codón TGC para cisteína entre el codón para el residuo phe del carboxilo terminal de la GH y el codón transduccional de parada TAA y expande el sitio cercano *Bam* HI, se utilizó conjuntamente con el BB34 5'GTAGCGCAGGCCCTTCCCAACCATT3' (SEC ID NO: 40) que se describió anteriormente. Luego del PCR y de los análisis de gel descritos anteriormente, la reacción a 46°C se utilizó para la clonación. Tres de los seis clones puestos a prueba se mostró que estaban orientados correctamente. Uno de estos se secuenció y se mostró que contenía la mutación stp192C deseada. La secuencia del resto del fragmento de PCR mutagénico de 188 p.b. *Bam* HI-*Bgl* II en este clon se confirmó como correcta.

Pueden utilizarse procedimientos análogos de PCR de mutagénesis para generar otras mutaciones de cisteína. La elección de las secuencias de los oligonucleótidos mutagénicos será dictada por la posición donde deba colocarse el residuo de cisteína deseado y la predilección de los sitios útiles de endonucleasas de restricción. Generalmente, se desea colocar la mutación, o sea, el segmento que no hibridiza, cerca del centro del oligonucleótido, para favorecer la unión del oligonucleótido al molde. Las temperaturas apropiadas de hibridización para cualquier oligonucleótido pueden determinarse empíricamente. También es deseable que el oligonucleótido mutagénico expanda un sitio único de restricción de manera que el producto de PCR pueda ser escindido para generar un fragmento que pueda clonarse fácilmente en un vector apropiado, o sea, un vector que pueda utilizarse para expresar la proteína o brindar sitios de restricción convenientes para extraer el gen mutado y clonarlo fácilmente en dicho vector de expresión. En ocasiones, los sitios de mutación y de restricción se separan mediante distancias mayores que lo deseable para la síntesis de oligonucleótidos sintéticos: generalmente se desea mantener tales oligonucleótidos por debajo de 80 bases de distancia, y las extensiones de 30-40 bases son las de mayor preferencia.

ES 2 297 889 T3

En los casos en que esto no sea posible, los genes escogidos para la mutagénesis pudieran ser recompuestos o resintetizados para incorporar sitios de restricción en posiciones apropiadas. Alternativamente, las variaciones de los protocolos de mutagénesis por PCR empleados anteriormente, tales como los denominados “Método Megaprimer” (Barik, S., pp. 277-286 en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods y Applications editado por B. A. White, 1993, Humana Press, Inc., Totowa, NJ) o “Gene Splicing by Overlap Extension” (Horton, R. M., pp. 251-261, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods y Applications, editado por B. A. White, 1993, Humana Press, Inc., Totowa, NJ) pueden emplearse también para construir dichas mutaciones.

6. Expresión de la GH en pCYB1

Para expresar la GH en *E. coli*, el pBBT120 (gen de la GH sin secuencia líder clonado en el vector de expresión *tac* pCYB1) y el pBBT114 (gen de la GH con secuencia líder stII clonada al vector de expresión *tac* pCYB1) fueron transformados en las cepas de *E. coli* JM109 y W3110. El vector parental pCYB1 también fue transformado en JM109 y W3110. A estas cepas se les otorgaron las siguientes designaciones:

BOB119: JM109 (pCYB1)

BOB130: W3110 (pCYB1)

BOB129: JM109 (pBBT120)

BOB133: W3110 (pBBT120)

BOB121: JM109 (pBBT114)

BOB132: W3110 (pBBT114)

Para la expresión, las cepas se cultivaron durante la noche a 37°C en medio Luria (LB) (Sambrook *et al* 1989) conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Estos cultivos saturados durante la noche se diluyeron a aproximadamente 0,03 OD a A₆₀₀ en LB contentivo de 100 µg/ml de ampicilina e incubados a 37°C en frascos de agitación en un agitador rotatorio, por lo regular, a 250-300 r.p.m. Las ODs se monitorearon y se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM cuando las ODs del cultivo alcanzaron aproximadamente de 0,25 a 0,5, por lo regular, entre 0,3 y 0,4. Los cultivos se muestrearon generalmente a 1, 3, 5 y ~16 horas después de la inducción. Los puntos de tiempo “aproximadamente 16 horas” representaban la incubación nocturna de los cultivos y los tiempos exactos variaron aproximadamente entre 15 y 20 horas. Las muestras de los cultivos inducidos y no inducidos se sedimentaron mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón de muestra 1x (50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% lauril sulfato de sodio, 10% glicerol, 0,1% de bromofenol azul) con la adición de 1% β-mercaptoetanol cuando fuese deseable. Las muestras se hirvieron durante ~10 minutos o se calentaron a 95°C durante ~10 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente antes de cargarse en geles de poliacrilamida con SDS o se almacenaron a -20°C si no se ensayaron inmediatamente. Las muestras se ensayaron en poliacrilamida profundida al 15% “Ready Gels” (Bio-Rad, Hercules CA) utilizando un aparato de electroforesis Ready Gel Cell (Bio-Rad) en correspondencia con los protocolos del vendedor. Por lo regular, los geles se ensayaron a 200 voltios durante ~35-45 minutos. Los geles se tiñeron con Azul Coomassie o se analizaron mediante electro-marcado Western Blot. La tinción con Coomassie de lisados de células enteras de las cepas BOB 129, BOB 133, BOB 121 y BOB 132 mostró una banda de unos 22 kD que comigraba con la GC purificada recombinante humana estándar comprada a Research Diagnostics Inc (Flanders, NJ). Esa banda era más notable en cultivos inducidos luego de su inducción durante la noche. Sin embargo, también se observó una banda de ese peso molecular en cultivos no inducidos de estas mismas cepas y también pudo observarse con y sin inducción en las cepas control BOB 119 y BOB 130 que portaban el vector de expresión pCYB1 carente del gen de la GH. Para clarificar esta observación, se llevaron a cabo análisis de Western Blot en lisados de células enteras de cultivos inducidos de las cepas BOB119, BOB130, BOB129, BOB133, BOB121 y BOB132. Las Western blots se llevaron a cabo con antisuero policlonal de conejo levantado contra la GH humana comprada a United States Biological; catálogo # G 9000-11 (Swampscott, MA). Este anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:5000 y su unión se detectó mediante el fragmento Fc de anti-IgG de conejo levantado en cabra, conjugado a fosfatasa alcalina (producto # 31341), comprado a Pierce (Rockford, IL). Este anticuerpo secundario se utilizó a una dilución de 1:10.000. La actividad de la fosfatasa alcalina se detectó utilizando el paquete ImmunoPure® Fast Red TR/AS-MX Substrate Kit (Pierce, Rockford IL), en correspondencia con los protocolos del vendedor. Los Western Blots demostraron claramente la presencia de la GH en los lisados de los cultivos inducidos de BOB129, BOB133, BOB121 y BOB132, en la post inducción, tanto al cabo de 3 horas, como al cabo de 16 horas. En el cultivo inducido de las cepas de control, BOB119 y BOB130, no se detectó la GH mediante Western blot en los puntos de tiempo post inducción de 3 ó 16 horas.

En estos experimentos preliminares, los rendimientos mayores de la GH se obtuvieron a partir de BOB132 W3110 (pBBT114), en el cual el gen de la GH se funde hacia abajo de la secuencia señal para la secreción stII. Esta cepa se probó aún más para determinar si la proteína de la GH se segregaba al periplasma como era de esperar. Se preparó un cultivo inducido de BOB132 tal como se describió y se sometió a choque osmótico en correspondencia con el procedimiento de Koshland y Botstein (*Cell* 20 (1980) pp. 749-760). Este procedimiento rompe la membrana exterior y libera los contenidos del periplasma hacia el medio circundante. La centrifugación subsiguiente separa los conte-

nidos periplasmáticos, presentes en el material flotante del resto de los componentes asociados a la célula. En este experimento, el grueso de la GH sintetizada por BOB132 se encontró localizado en el periplasma. Este resultado es consistente con el hallazgo de que la mayor parte del total de la GH también resulta indistinguible, en tamaño, del estándar de la GH purificada, lo que indicaba que la secuencia señal stII había sido eliminada. Esto es indicativo de secreción. Un cultivo a mayor escala (500 ml) de BOB132 se indujo también, se cultivó durante la noche y se sometió a choque osmótico en correspondencia con el procedimiento descrito por Hsiung *et al.*, 1986 (Bio/Technology 4, pp. 991-995). El análisis de gel demostró nuevamente que el grueso de la GH producida era soluble, periplasmática y no distinguible, en tamaño, del estándar de la GH. Este material podía también ser unido de manera cuantitativa y eluído de, una columna de Q-Sefarosa utilizando condiciones muy similares a las descritas para la GH recombinante humana por Becker y Hsiung, 1986 (FEBS Lett 204 pp145-150).

7. Clonación del receptor de la GH humana

El receptor de la GH humana se clonó mediante PCR utilizando el cebador directo BB3 y el cebador inverso BB4. BB3 tiene la secuencia: 5'-CCCCGGATCCGCCACCATGGATCTCTGGCAGCTGCTGTT-3' (SECID NO: 26). BB4 tiene la secuencia: 5'CCCCGTCGACTCTAGAGCTATTAATAACGTAGCTCTTGGG-3' (SEC ID NO: 27).

El molde fue un ADNc de simple cadena, preparado a partir de hígado humano (disponible comercialmente en los Laboratorios CLONTECH). Los cebadores BB3 y BB4 contienen sitios de restricción *Bam*HI y *Sa*II, respectivamente, con propósitos de clonación. Las reacciones de 100 μ l de PCR contenían 2,5 ng del ADNc de simple cadena y 20 picomoles de cada cebador en tampón de PCR 1 x (tampón Perkin-Elmer contenido de MgCl₂), concentración 200 micromolar de cada uno de los cuatro nucleótidos dA, dC, dG y dT, 2,5 unidades de Taq polimerasa (Perkin-Elmer) y 2,5 unidades de PFU polimerasa (Stratagene Inc.). Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 96°C durante 3 minutos, 35 ciclos de (95°C, 1 minuto; 58°C durante 30 segundos; 72°C durante 2 minutos), seguidos de 10 minutos a 72°C. El equipo para el ciclado térmico empleado fue el Amplitron II Thermal Cycler (Thermolyne). El producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb fue digerido con *Bam*HI y *Sa*II, y ligado en el plásmido pUC19 de corte similar (New England BioLabs). Sin embargo, ninguno de los transformantes obtenidos de esta reacción de ligación contenía un fragmento de PCR de 1,9 kb. Leung *et al.* (Nature 1987, 330 pp. 537-543) tampoco consiguió obtener clones de ADNc con la longitud total del receptor de GH en pUC19. A continuación, el fragmento de PCR se clonó en un vector de poca cantidad de copias, pACYC184 (New England BioLabs) en los sitios *Bam*HI y *Sa*II de este vector. Dichos clones se obtuvieron a frecuencias razonables, pero las cepas de *E. coli* portadoras del fragmento de PCR clonado crecieron pobremente, formando pequeñas colonias de aspecto heterogéneo en presencia de cloranfenicol, que se utiliza para seleccionar las que mantienen el pACYC184.

El fragmento de PCR se clonó, simultáneamente, en pCADN3.1(+) (Invitrogen). El producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb fue digerido con *Bam*HI y *Sa*II y ligado a sitios de clonación *Bam*HI y *Xho*I de pCADN3.1(+). Sólo los transformantes no frecuentes de esta ligación contenían el ADNc del receptor de GH clonado, y se encontró que todos ellos contenían pérdidas de segmentos de la secuencia codificante del receptor. Uno de estos clones se secuenció y se encontró que contenía una pérdida de 135 bp dentro de la secuencia de codificación del receptor de GH: la secuencia del resto del gen estaba según la reportada por Leung *et al.* (1987).

8. Clonación del receptor de GH de conejo

El receptor de GH de conejo se clonó mediante PCR utilizando el cebador directo BB3 (antes descrito) y el cebador inverso BB36. El BB36 tiene la secuencia 5'CCCCGTCGACTCTAGAGCCATTAGATACAAAGCTCTTGGG3' (SEC ID NO: 41) y contiene sitios de restricción *Xba*I y *Sa*II con objetivo de clonación. El hígado de conejo poli(A)⁺ mARN se compró a CLONTECH Inc. y se utilizó como sustrato en la síntesis de la primera cadena de ADNc de simple cadena para producir moldes para amplificación por PCR. La síntesis de la primera cadena del ADNc de simple cadena se llevó a cabo utilizando un paquete 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) de Boehringer Mannheim Corp (Indianápolis, IN), en correspondencia con los protocolos del vendedor. Se llevaron a cabo síntesis paralelas de la primera cadena del ADNc utilizando hexámeros aleatorios de BB36 como cebadores. Las reacciones de PCR subsiguientes con los productos de la síntesis de la primera cadena como moldes, se llevaron a cabo con cebadores BB3 y BB36, en correspondencia con el protocolo del paquete 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) y utilizando 2,5 unidades de polimerasa Amplitac de ADN (Perkin-Elmer) y 0,625 unidades de polimerasa Pfu de ADN (Stratagene). Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 96°C durante 3 minutos, 35 ciclos de (95°C, 1 minuto; 58°C durante 30 segundos; 72°C durante 2 minutos), seguido de 10 minutos a 72°C. El equipo para el ciclado térmico empleado fue el Amplitron II Thermal Cycler (Thermolyne). El producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb se observó en las reacciones de PCR utilizando como molde ADNc cebado mediante hexámero aleatorio o ADNc cebado con BB36. El ADNc cebado con hexámero aleatorio se utilizó en experimentos subsiguientes de clonación. Se digirió con *Bam* HI y *Xba*I y se corrió sobre gel de agarosa al 1,2%. Esta digestión genera dos fragmentos (aproximadamente 365 p.b. y 1600 pb) debido a que el gen del receptor de GH de conejo contiene un sitio interno *Bam* HI. Ambos fragmentos se purificaron en gel. Inicialmente el fragmento *Bam* HI-*Xba*I de aproximadamente 1600 p.b. se clonó en pCADN3.1(+), que había sido digerido con estas mismas enzimas. Estos clones se obtuvieron fácilmente a frecuencias razonables y no mostraron evidencia de pérdidas determinadas mediante digestiones de restricción y secuenciación subsiguiente. Para generar un clon de longitud total, uno de los plásmidos contentivos del fragmento *Bam* HI-*Xba*I de 1600 p.b. (pCADN3.1(+): rab-ghr-2A) se digirió con *Bam* HI, se trató con Fosfatasa Alcalina Intestinal vacuna (Promega) en correspondencia con los protocolos del vendedor, se purificó en gel y se ligó con el fragmento *Bam* HI de aproximadamente 365 p.b. purificado en gel, que contiene la porción 5' del gen del receptor de GH de conejo. Los

transformantes de esta ligación se escogieron y analizaron mediante digestión de restricción y PCR para confirmar la presencia del fragmento de aproximadamente 365 p.b. y para determinar su orientación relativa al segmento distal del gen del receptor de GH de conejo. Tres de los cuatro clones analizados contenían el fragmento de aproximadamente 365 p.b. clonado en la orientación correcta para la reconstitución del gen del receptor de GH de conejo. La ausencia de complicaciones en la clonación en *E. coli* del gen de conejo, en contraste con el gen humano, es consistente con los resultados de Leung *et al.* (1987), que también obtuvo fácilmente clones de ADNc de longitud total para el gen receptor de GH de conejo, pero fue incapaz de clonar un ADNc de longitud total del gen humano en *E. coli*. El receptor de GH de conejo puede emplearse en ensayos que utilizan GH humana como ligando, ya que se ha demostrado que la GH humana se une al receptor de conejo con alta afinidad (Leung *et al.* 1987). Los plásmidos que contienen el receptor de GH de conejo clonado debían secuenciarse para identificar el ADNc del receptor de GH de conejo con la secuencia correcta antes de su uso.

9. Construcción de un gen quimérico humano/de conejo del gen del receptor de GH

Como alternativa al receptor de conejo, pudiera construirse un receptor quimérico que combine el dominio extracelular del receptor humano con los dominios transmembrana y citoplasmáticos del receptor de conejo. Dicho receptor quimérico podría construirse recombinando los genes humanos y de conejo en el sitio único *Nco* I presente en cada uno de ellos (Leung *et al.* 1987). Dicho recombinante, contentivo del segmento del gen humano ubicado a 5' o "hacia arriba" del sitio *Nco* I y el segmento del gen de conejo 3', o "hacia abajo" respecto al sitio *Nco* I codificaría exactamente un receptor quimérico del tipo deseado, teniendo el dominio extracelular del receptor humano con los dominios de transmembrana y citoplasmático del receptor de conejo. Esto permitiría el análisis de la interacción de la GH, las luteínas de GH, y las muteínas de GH PEG-iladas con el sitio de enlace del receptor natural pero podría evitar la necesidad de clonar el receptor de GH humano de longitud total en *E. coli*.

Las muteínas de GH pueden expresarse en una diversidad de sistemas de expresión tales como bacterias, levadura o células de insectos. Los vectores para la expresión de las muteínas de GH en estos sistemas están disponibles comercialmente a partir de un número de proveedores como Novagen Inc. (pET15b para expresión en *E. coli*), New England BioLabs (pC4B1 para expresión en *E. coli*) Invitrogen (pVL1392, pVL1393 y pMELBAC para expresión en células de insectos utilizando Baculovirus como vectores, vectores Pichia para expresión en células de levadura, y pcADN3 para expresión en células de mamíferos). La GH se ha producido con éxito en *E. coli* como proteína citoplásmica y como proteína de secreción, periplasmática, utilizando las secuencias señal *OmpA* o *StII* en *E. coli*, para lograr la secreción de la proteína al espacio periplasmático (Chang *et al.*, 1987; Hsiung *et al.*, 1986). Es preferible que las muteínas de GH se expresen como proteínas secretadas, de manera que no contengan un residuo de Terminal N de metionina, que no está presente en la proteína humana natural. Para la expresión en *E. coli*, las secuencias de ADN que codifican para GH o las muteínas de GH pueden clonarse en vectores de expresión de *E. coli*, tales como el pET15b que utiliza el promotor fuerte T7 o el pCYB1 que utiliza el promotor TAC. La adición de IPTG (isopropiltiogalactopiranosido, disponible en Sigma Chemical Company) al medio de crecimiento, puede inducir la expresión de la proteína. La GH recombinante se segregará al espacio periplasmático del cual puede ser liberada y luego purificada, luego de choque osmótico (Becker y Hsiung, 1986). La proteína puede purificarse aún más utilizando otros métodos cromatográficos, tales como intercambio iónico, interacción hidrófoba, exclusión por talla y cromatografía de fase reversa, todos los cuales son bien conocidos en la técnica (e.g. véase Becker y Hsiung, 1986). Las concentraciones de proteína pueden determinarse utilizando paquetes de ensayo comercialmente disponibles tales como los vendidos por los Laboratorios BioRad (Richmond, CA). Si las proteínas GH son insolubles cuando se expresen en *E. coli*, pueden ser recubiertas utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase Cox *et al.*, 1999 y las solicitudes de patentes WO9422466 y WO9412219).

De manera alternativa, las proteínas pueden expresarse en células de insectos como proteínas secretadas. El plásmido de expresión puede modificarse para contener la secuencia señal de GH para provocar la secreción de la proteína al medio. El ADNc puede clonarse en vectores comercialmente disponibles, p.e., pVL1392 de Invitrogen Inc., y utilizarse para infectar las células de insectos. La GH y las muteínas de GH pueden purificarse a partir del medio condicionado, utilizando procedimientos convencionales de cromatografía. Pueden utilizarse anticuerpos contra rhGH de conjunto con Western blots para localizar fracciones contentivas de las proteínas GH durante la cromatografía. Alternativamente, las fracciones contentivas de GH pueden identificarse utilizando ensayos ELISA.

Las variantes de GH con adición de cisteína pueden expresarse también como proteínas intracelulares o secretadas en células eucariotas tales como la levadura, células de insectos, o células de mamíferos. Los vectores para la expresión de las proteínas y los métodos para la realización de tales experimentos se describen en catálogos de diversas compañías suministradoras tales como Invitrogen, Inc. y ClonTech, Inc. La GH y las muteínas de GH pueden purificarse utilizando procedimientos convencionales de cromatografía.

La actividad biológica de las muteínas de GH puede medirse utilizando una línea de células que prolifere en respuesta a la GH. Fuh *et al.* (1992) crearon una línea celular que responde a la GH, mediante la transformación estable de una línea celular de leucemia mieloide, FDC-P1, con un receptor quimérico contentivo del dominio extracelular del receptor de GH de conejo fusionado al receptor G-CSF de ratón. Esta línea celular prolifera en respuesta a la GH con una concentración máxima efectiva media (EC_{50}) de 20 picomolar. Puede construirse una línea de células similar utilizando las secuencias publicadas de estos receptores y técnicas estándar de biología molecular (Fuh *et al.*, 1992). De modo alternativo, el dominio extracelular del receptor de la GH humana puede fusionarse al receptor de la G-CSF de ratón utilizando las secuencias publicadas de estos receptores y técnicas estándar de biología molecular. Las

células transformadas que expresan el receptor quimérico pueden identificarse mediante citometría de flujo utilizando GH marcada, debido a la capacidad de las células transformadas para unir GH radiomarcada, o debido a la capacidad de las células transformadas de proliferar en respuesta a la GH añadida. La GH purificada y las muteínas de GH pueden someterse a prueba en ensayos de proliferación celular utilizando células que expresen el receptor quimérico para medir actividades específicas de las proteínas. Las células pueden colocarse en placas de 96 pocillos con diversas concentraciones de GH o muteínas de GH. Después de 18 horas, las células se tratan durante 4 horas con timidina tritiada y se cultivan para determinar la radioactividad incorporada. La EC₅₀ puede determinarse para cada muteína. Los ensayos deben realizarse al menos tres veces para cada muteína utilizando pocillos triplicados para cada punto de datos. Se prefieren las muteínas de GH que despliegan niveles óptimos similares de estimulación y valores EC₅₀ comparables a o mayores que los de la GH de tipo salvaje.

Las muteínas de GH que retienen actividad *in vitro* pueden ser PEG-iladas utilizando un PEG-maleímida de 8 kDa reactivo a la cisteína (o PEG-vinilsulfona) disponible comercialmente en Shearwater, Inc. Por lo general, los métodos para PEG-ilar las proteínas con estos reactivos serán similares a los descritos en las solicitudes de patentes WO9412219 y WO9422466 y la solicitud PCT US95/06540, con modificaciones menores. Las proteínas recombinantes pueden reducirse parcialmente con ditioneitol (DTT) para alcanzar una PEG-ilación óptima de la cisteína libre. Aunque la cisteína libre no está involucrada en un enlace disulfuro, es relativamente no reactiva a los PEGs reactivos a la cisteína a menos que se realice este paso de reducción parcial. La cantidad de DTT requerida para reducir parcialmente cada muteína puede determinarse empíricamente utilizando un intervalo de concentraciones de DTT. Típicamente, un exceso molar de 5 a 10 veces de DTT durante 30 minutos a temperatura ambiente es suficiente. La reducción parcial puede detectarse mediante un ligero cambio en el perfil de la dilución de la proteína a partir de una columna de fase reversa. Debe tenerse cuidado de no reducir en exceso la proteína y exponer residuos adicionales de cisteína. La reducción excesiva puede detectarse mediante HPLC de fase reversa (la proteína tendría un tiempo de retención similar a la proteína reducida totalmente y desnaturalizada) y mediante la aparición de moléculas de GH contenidas de dos PEGs (detectables mediante un cambio en el peso molecular en el SDS-PAGE). La GH de tipo salvaje puede servir como control, ya que no debe PEG-ilarse bajo condiciones similares. El exceso de DTT puede eliminarse mediante cromatografía de exclusión por tamaños utilizando columnas de fase reversa. La proteína parcialmente reducida puede hacerse reaccionar con diversas concentraciones de PEG-maleímida (PEG: proporciones molares de la proteína de 1:1, 5:1, 10:1 y 50:1) para determinar la proporción óptima de los dos reactivos. La PEG-ilación de la proteína puede monitorearse mediante cambio del peso molecular utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La cantidad más baja de PEG que arroja cantidades significativas de producto mono-PEG-ilado sin aportar producto di-PEG-ilado se considerará óptima (80% de conversión a producto mono-PEG-ilado es considerada como buena). Generalmente la proteína mono-PEG-ilada puede purificarse a partir de proteína no PEG-ilada y PEG no reaccionado mediante exclusión por talla o cromatografía de intercambio iónico. La proteína PEG-ilada purificada puede someterse a prueba mediante el ensayo de proliferación celular antes descrito para determinar su actividad específica.

Los experimentos anteriores permitirán la identificación de aminoácidos en el lazo B-C, lazo C-D o extremo del terminal N del lazo A-B en GH que pueden ser modificados a residuos de cisteína, PEG-ilados, y retener la actividad biológica *in vitro*. Estas muteínas pueden ser sometidas a prueba en modelos de enfermedad animal bien conocidos en la técnica.

Pueden llevarse a cabo experimentos para confirmar que la molécula de PEG se ha enlazado a la proteína en el sitio apropiado. Esto puede lograrse mediante digestión proteolítica de la proteína, purificación del péptido PEG (que tendrá un alto peso molecular) mediante exclusión por tamaño, intercambio iónico o cromatografía de fase reversa, seguido por secuenciación del aminoácido o espectroscopía de masas. El aminoácido unido a PEG aparecerá como una ausencia en el ensayo de secuenciación aminoácídica.

Las propiedades farmacocinéticas de las proteínas PEG-GH pueden determinarse como sigue, o como las describe la solicitud de patente WO9422466. Los pares de ratas o de ratones pueden recibir una inyección intravenosa de bolo de las proteínas que se prueban. Los niveles de circulación de las proteínas se miden en el curso de 24 horas retirando una pequeña muestra de sangre de los animales en los puntos de tiempo deseados. Los niveles de circulación de las proteínas que se prueban pueden cuantificarse utilizando ensayos ELISA. Pueden llevarse a cabo experimentos adicionales utilizando la vía subcutánea para administrar las proteínas. Experimentos similares deben llevarse a cabo con la proteína no PEG-ilada para servir como control. Estos experimentos revelarán si la inserción de un reactivo de tipo PEG incrementará la vida media circulante de la proteína con relación a la proteína no PEG-ilada. Las moléculas de PEG mayores y/o la inserción de múltiples moléculas PEG deben extender la vida media en circulación más que las moléculas de PEG de menor tamaño.

Las proteínas PEG-GH pueden someterse a prueba en modelos de deficiencia en la hormona de crecimiento en roedores (Cox *et al.*, 1994) y de caquexia (Tomas *et al.*, 1992; Read *et al.*, 1992), para determinar esquemas óptimos de dosificación y demostrar eficacia. Estos estudios pueden explorar moléculas de PEG de diferentes tamaños, e. g., 8 y 20 kDa y esquemas de dosificación para determinar el tamaño de PEG óptimo y el esquema de dosificación. Se espera que las moléculas de PEG mayores extiendan la media vida circulante más que las moléculas de PEG menores y que requieran dosis menos frecuentes. Sin embargo, las proteínas más grandes pueden tener potencialmente volúmenes de distribución reducidos *in vivo*; por tanto, es posible que un PEG de 20 kDa unido a la GH limitará la biodisponibilidad, reduciendo su eficacia. Los modelos en roedores permitirán determinar si éste es el caso. Una vez que se hayan determinado los esquemas de dosificación óptima y de tamaños de PEG, la eficacia de la PEG-GH o GH

puede compararse en los modelos animales. Aunque las proteínas PEG GH que tienen actividad GH se incluyen en la presente invención, las proteínas PEG-GH preferidas son las que estimulan un crecimiento igual o superior al de la GH, pero que pueden ser administradas con menor frecuencia. Las PEG-GH deben ser más eficaces que la GH cuando ambos se administran utilizando los esquemas de dosificación menos frecuentes.

Un modelo de deficiencia de la GH que puede utilizarse es una rata hipofisectomizada. La GH estimula la ganancia en peso corporal y el crecimiento de huesos y cartílagos en este modelo (Cox *et al.*, 1994). Las ratas hipofisectomizadas pueden comprarse a Charles River. Las ratas pueden inyectarse con GH, PEG-GH o placebo y la ganancia en peso puede medirse diariamente en un período de 10 a 14 días. Al momento del sacrificio, puede determinarse el ancho de la epífisis de la tibia como medida del crecimiento óseo. Los métodos experimentales para llevar a cabo estos estudios se describen en Cox *et al.*, (1994).

La eficacia de la PEG-GH en modelos de caquexia en roedores puede ser probada de manera similar. La administración diaria de dexametasona, mediante bombas osmóticas o la inyección subcutánea puede utilizarse para inducir la pérdida de peso (Tomas *et al.*, 1992; Read *et al.*, 1992, solicitud de patente PCT de US95/06540).

Todos los documentos citados en la presente solicitud se incorporan aquí como referencia.

Los análogos de proteínas presentados aquí pueden utilizarse para los usos terapéuticos conocidos de las proteínas nativas esencialmente en las mismas formas y dosis todas bien conocidas en la técnica.

Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención, presentadas a manera de ejemplo, se describen en la presente solicitud con particularidad, los expertos en la técnica reconocerán cambios, modificaciones, adiciones y aplicaciones diferentes de las específicamente descritas aquí y podrán adaptar las realizaciones preferidas y los métodos sin apartarse del espíritu de esta invención.

Referencias

Abdel-Meguid, S.S., Shieh, h.-S., Smith W.W., Dayringer, H.E., Violand, B.N. y Bentle, L.A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6434-6437.

Abuchowski, A.; Kazo, G.M., Verhoest, C.R., van Es, T., Kafkewitz, D., Nucci, M.L., Viau, A.T. y Davis, F.F. (1984) *Cancer Biochem. Biophys.* 7: 175-186.

Aggarwal, B.B. (1998) Human Cytokines. Handbook for Basic y Clinical Research. Volume III. *Blackwell Science*, Malden, MA.

Aggarwal, B.B. y Gutterman, J.U. (1992) Human Cytokines. Handbook for Basic and Clinical Research. Volume I.

Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA. **Aggarwal, B.B. y Gutterman, J.U.** (1996) Human Cytokines. Handbook for Basic and Clinical Research. Volume II. *Blackwell Science*, Cambridge, MA.

Anderson, D.M., Johnson, L., Glaccum, M.B., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Valentine, V., Kirstein, M.N., Shapiro, D.N., Morris, S.W., Grabstein, K. y Cosman, D. (1995) *Genomics* 25: 701-706.

Balkwill, F.R. (1986) *Methods Enzymology* 119: 649-657.

Bartley, T.D., Bogenberger, J. et al., (1994) *Cell* 77: 1117-1124.

Bazan, F. (1991) *Immunology Today* 11: 350-354.

Bazan, J.F. (1992) *Science* 257: 410-411.

Becker, G.W. y Hsiung, H. M. (1986) *FEBS Letters* 204: 145-150.

Bill, R.M., Winter, P.C., McHale, C.M., Hodges, V.M., Elder, G.E., Caley, J., Flitsch, S.L., Bicknell, R. Lappin, T.R.J. (1995) *Biochem. Biophys. Acta* 1261: 35-43.

Bittorf, T., Jaster, R., Brock, J. (1993) *FEBS Letters* 336: 133-136.

Blatt, L.M., Davis, J.M., Klein, S.B. y Taylor, M.W. (1996) *Journal of Interferon y cytokine Research* 16: 489-499.

Boissel, J.-P., Lee, W.-R., Presnell, S.R., Cohen, F.E. y Bunn, H.F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 15983-15993.

Butler, C.A. (1996) Lehman Brothers Technical Report "A Paradigm for Success".

ES 2 297 889 T3

Cantrell, M.A., Anderson, D., Cerretti, D.P., Price, V., McKereghan, K., Tushinski, R.J., Mochizuki, D.Y., Larsen, A., Grabstein, K., Gillis, S. y Cosman, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6250-6254.

5 Cerretti, D.P. *et al.* (1988) *Molecular Immunology* 25: 761.

Chang, C.N., Rey, B., Bochner, B., Heyneker, H. y Gray, G. (1987) *Gene*: 189-196.

Cotes, P.M. y Bangham, D.R (1961) *Nature* 191: 1065-1067

10 Cox, G.N., McDermott, M.J., Merkel, E., Stroh, C.A., Ko, S.C., Squires, C.H., Gleason, T.M. y Russell, D. (1994) *Endocrinology* 1.35: 1913-1920.

Cunningham, B.C. y Wells, J.A. (1989) *Science* 244: 1081-1085.

15 Cunningham, B.C., Jhwani, P., Ng, P. y Wells, J.A. (1989) *Science* 243: 1330-1336.

Cunningham, B.C., Ultsch, M., de Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R. y Wells, J.A. (1991) *Science* 254: 821-825.

20 D'Andrea, A.D., Lodish, H.F. y Wong, G.G. (1989) *Cell* 57: 277-285.

Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y. and Yancopoulos, G.D. (1993) *Science* 260: 1805-1808.

25 DeChiara, T.M., Erlitz, F. y Tarnowski, k, S.J. (1986) *Methods Enzymology*, 119: 403-15.

de la Liosa, P., Chene, N. y Martal, J. (1985) *FEBS Letts.* 191: 211-215

30 Delorme, E., Lorenzini, T., Giffin, J., Martin, F., Jacobsen, F., Boone, T., Elliot, S. (1992) *Biochemistry* 31: 9871-9876.

de Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D. *et al.* (1994) *Nature* 369: 533-538.

35 de Vos, A.M., Ultsch, M. y Kossiakoff, A.A. (1992) *Science* 255: 306-312.

Devos, R., Plaetinck, G., Cheroutre, H., Simons, G., Degrave, W., Tavernier, J., Remaut, E. y Fiers, W. (1983) *Nucleic Acids Research* 11: 4307.

40 Diederichs, K., Boone, T. y Karplus, A. (1991) *Science* 154: 1779-1782.

Dorssers, L., Burger, H., Bot, F., Delwel, R., Van Kessel, A.H.M.G., Lowenberg, B. y Wagemaker, G. (1987) *55: 115-124.*

45 Dube, S., Fisher, J.W., Powell, J.S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 17526-17521.

Fish, E.N., Banerjee, K., Levine, H.L. y Stebbing, N. (1986) *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 52-56.

Foster, D.C., Sprecher, C.A., Grant, F.J., Kramer, J.M. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 13023-13027.

50 Fukuda, M.N., Sasaki, H., Fukuda, M. (1989) *Blood* 73: 84-89.

Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T. *et al.*, (1979) *Nature* 281: 544-548.

55 Goeddel, D.V., Yelverton, E., Ullrich, A., Heyneker, H.L., Miozzari, G., Holmes, W., Seeburg, P.H., Dull, T., Mat, L., Stebbing, N., Crea, R., Maeda, S., McCandliss, R., Sloma, A., Tabor, J.M., Gross, M., Familletti, P.C. y Pestka, S. (1980) *Nature* 287: 411-416.

Goldwasser, E. y Gross, M. (1975) *Methods Enzymology* 37: 109-121.

60 Goodson, R.J. y Katre, N.V. (1990) *Biotechnology* 8: 343-346.

Goodwin, R.G., Lupton, S., Schmierer, A., Hjerrild, K.J., Jerzy, R., Clevenger, W., Gillis, S., Cosman, D. y Namen, A.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 302-306.

65 Gough, N.M. *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 2623-2627.

Gubler, U., Chua, A.O., Schoenhaut, D.S., Dwyer, C.M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Familletti, P.C. y Gately, M.K. (1991) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 4143-4147.

ES 2 297 889 T3

- Hershfield, M.S., Buckley, R.H., Greenberg, M.L. *et al.*, (1987) *N. Engl. J. Medicine* 316: 589-596.
- Hill, C.P., Osslund, T.D. y Eisenberg, D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:#5167-5171.
- 5 Hoffman, R.C., Andersen, H., Walker, K., Krakover, J.D., Patel, S., Stamm, M.R and Osborn, S.G. (1996) *Biochemistry* 35:14849-14861.
- Hsiung, H.M., Mayne, N.G. y Becker, G.W. (1986) *Biotechnology* 4: 991-995.
- 10 Hercus, T.R, Bagley, C.J., Cambareri, B., Dottore, M., Woodcock, J.M., Vadas, M.A., Shannon, M.F., y Lopez, A.F. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5838-5842.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S.-I., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. y Kishimoto, T. (1986) *Nature* 324: 73-76.
- 15 Horisberger, M.A. y Di Marco, S. (1995) *Pharmac. Ther.* 66: 507-534.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods y Applications*. Academic Press, San Diego, CA.
- 20 Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R. *et al.*, (1985) *Nature* 313: 806-810.
- Karpusas, M., Nolte, M., Benton, C.B., Meier, W., Lipscomb, W.N. y Goelz, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11813-11818.
- 25 Katre, N.V. (1990) *J. Immunology* 144: 209-213.
- Katre, N.V., Knauf, M.J. y Laird, W.J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1487-1491.
- 30 Kawasaki, E.S. *et al.*, (1985) *Science* 230: 291.
- Kawashima, I., Ohsumi, J., Mita-Honjo, K., Shimoda-Takano, Ishikawa, H., Sakakibara, S., Miyadai, K. y Takiguchi, Y. (1991) *FEBS Letts.* 283: 199-202.
- 35 Kinesley, D.M. (1994) *Genes Dev.* 8: 133-146.
- Komatsu, N., Nakauchi, H., Miwa, A., Ishihara, T., Eguguchi, M. *et al.*, (1991) *Cancer Research* 51, 341-348.
- 40 Kruse, N., Tony, H.-P. y Sebald, W. (1992) *EMBO J.* 11: 3237-3244.
- Lam, A., Fuller, F., Miller, J., Kloss, J., Manthorpe, M., Varon, S. y Cordell, B. (1991) *Gene* 102: 271-276.
- 45 Kubota, N., Orita, T., Hattori, K., Oh-eda, M., Ochi, N. y Yamazaki, T. (1990) *J. Biochem.* 107: 486-492.
- Kuga, T., Komatsu, Y., Yamasaki, M., De4kine, S., Miyaji, H., Nishi, T., Sato, M., Yokoo, Y., Asano, M., Okabe, M., Morimoto, M. y Itoh, S. (1989) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 159: 103-111.
- 50 Kunkel, T.A., Roberts, J.D. y Zakour, R.A. (1987) *Methods in Enzymology* 154: 367-382.
- Lange, B., Valtieri, M., Santoli, D., Caracciolo, D., Mavilio, F., Gemperlein, I., Griffin, C., Emanuel, B., Finan, J., Nowell, P. y Rovera, G. (1987) *Blood* 70: 192-199.
- 55 Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Gemmell, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K.-I. y Rennick, D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4360-4364.
- Lewis, J.A. (1995) Chapter 9: Antiviral activity of cytokines. pp. 129-141.
- 60 Li, C.H. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 46: 31-41.
- Lin, F.-K. (1996) United States Patent # 5,547,933.
- Lin, F.-K., Suggs, S., Lin, C.-H., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 7580-7584.
- 65 Linsley, P.S., Kallestad, J., Ochs, V. y Neubauer, M. (1990) 10: 1882-1890.
- Livnah, O., Stura, E.A., Johnson, D.L. *et al.*, (1996) *Science* 273: 464-471.

ES 2 297 889 T3

- Lu, H.S., Clogston, C.L., Narhi, L.O., Merewether, L.A.; Pearl, W.R. y Boone, T.C. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 8770-8777.
- Lydon, N.B., Favre, C., Bore, S., Neyret, O., Benureau, S., Levine, A.M., Seelig, G.F., Nagabhushan, T. L. y Trotta, P.P. (1985) *Biochemistry* 24: 4131-41.
- MacGillivray, M.H., Baptista, J. y Johnson, A. (1996) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1806-1809.
- Malik, N., Kallestad, J.C., Gunderson, N.L., Austin, S.D., Neubauer, M.G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J.M., Shoyab, M., Wei, C.-M., Linsley, P.S. y Rose, T.M. (1989) *Molecular y Cellular Biology* 9: 2847-2853.
- Martial, J., Chene, N. y de la Llosa, P. (1985) *FEBS. Letts.* 180: 295-299.
- Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D. y Goodman, H.M. (1979) *Science* 205: 602-606.
- Matthews, D.J., Topping, R.S., Cass, R.T. y Giebel, L.B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9471-9476.
- McKay, D.B. (1992) *Science* 257: 412.
- McKenzie, A.N.J., Culpepper, J.A., Malefyt, R. de W., Briere, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., Menon, S., de Vries, J.E., Banchereau, J., y Zurawski, G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3735-3739.
- Meyers, F.J., Paradise, C., Scudder, S.A., Goodman, G. y Konrad, M. (1991) *Clin. Pharmacol. Ther.* 49: 307-313.
- Milburn, M.V., Hassell, A.M., Lambert, M.H., Jordan, S.R., Proudfoot, A.E., Graber, P. and Wells, T.N.C. (1993) *Nature* 363: 172-176.
- Mills, J.B., Kostyo, J.L., Reagan, C.R., Wagner, S.A., Moseley, M.H. y Wilhelm, A.E. (1980) *Endocrinology* 107: 391-399.
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.-M., Dumont, X., Guilemot, J.-C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C., Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P. y Caput, D. (1993) *Nature* 362: 248-250.
- Moreau, J.-F., Donaldson, D.D., Bennett, F., Witek-Giannotti, J., Clark, S.C. y Wong, G.G. (1988) *Nature* 336: 690-692.
- Mott, H.R. y Campbell, I.D. (1995) *Current Opinion in Structural Biology* 5: 114-121.
- Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D. y Goodman, H.M. (1979) *Science* 205: 602-606.
- Nagata, S. (1994) in *Cytokines y Their Receptors*, N.A. Nicola ed., *Oxford University Press*, Oxford, pp. 158-160.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oh-eda, M., Nomura, H. y Ono, M. (1986a) *Nature* 319: 415-418.
- Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Yamamoto, O., Hirata, Y., Kubota, N., Oh-eda, M., Nomura, H. y Yamazaki, T. (1986b) *EMBO J.* 5: 575-581.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. (1992) *Caiculovirus Expression Vectors*, W.H. Freeman Co. publishers, New York.
- Otsuka, T., Miyajima, A., Brown, N., Otsu, K., Abrams, J., Saeland, S., Caux, C., De Waal-Malefyt, De Vries, J., Meyerson, P., Yokota, K., Gemmell, Rennick, D., Lee, F., Arai, N., Arai, K.-I. y Yokota, T. (1988) *J. Immunology* 140: 2288-2295.
- Owers-Narhi, L., Arakawa, T., Aoki, K.H., Elmore, R., Rohde, M.F., Boone, T., Strickland, T.W. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 23022-23026.
- Ozes, O.S., Reiter, Z., Klein, S., Blatt, L.M. y Taylor, M.W. (1992) *J. Interferon Research* 12: 55-59.
- Paonessa, G., Graziani, R., de Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Ssalvati, A.L., Toniatti, C. y Ciliberto, G. (1995) *EMBO J.* 14: 1942-1951.
- Park, L.S., Waldron, P.E., Friend, D., Sassenfeld, H.M., Price, V., Anderson, D., Cosman, D., Andrews, R.G., Bernstein, I.D. y Urdal, D.L. (1989) *Blood* 74: 56-65.

ES 2 297 889 T3

- Paul, S.R., Bennett, F., Calvetti, J.A., Kelleher, K., Wood, C.R., O'Hara, R.M., Leary, A.C., Sibley, B., Clark, S.C., William, D.A. y Yang, Y.-C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7512-7516.
- 5 Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. y Samuel, C.E. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56: 727-777.
- Pickering, L.A., Kronenberg, L.H. y Stewart, W.E., II (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5938-5942.
- 10 Powers, R., Garrett, D.S., March, C.J., Frieden, E.A., Gronenborn, A.M. y Clore, G.M. (1992) *Science* 256: 1673-1677.
- 10 Radhakrishnan, R., Walter, L.J., Hruka, A., Reichert, P., Trotta, P.P., Nagabhushan, T. L. y Walter, M.R. (1996) *Structure* 4: 1453-1463.
- 15 Read, L.C., Tomas, F.M., Howarth, G.S., Martin, A.A., Edson, K.J., Gillespie, C.M., Owens, P.C. y Ballard, F.J. (1992) *J. Endocrinology* 133: 421-431.
- Redfield, C., Smith L.J., Boyd, J., Lawrence, G.M.P., Edwards, R.G., Smith, R.A.G., y Dobson, C.M. (1991) *Biochemistry* 30: 11029-11035.
- 20 Robinson, R.C., Grey, L.M., Stauton, D., Vankelecom, H., Vemallis, A.B., Moreau, J.-F., Stuart, D.I., Heath, J.K. y Jones, E.Y. (1994) *Cell* 77: 1101-1116.
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. y Fukuda, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 12059-12076.
- 25 Sasaki, H. Ochi, N., Dell, A. y Fukuda, M. (1988) *Biochemistry* 27: 8616-8626.
- Shaw, G., Veldman, G. y Wooters, J.L. (1992) United States Patent 5,166,322.
- Shirafuji, N., Asano, S., Matsuda, S., Watari, K., Takaku, F. y Nagata, S. (1989) *Exp Hematol.* 17: 116-119.
- 30 Silvennoinen, O. y Ihle, J.N. (1996) Signalling by the Hematopoietic Cytokine Receptors, RG. Landes, Company, Austin, TX.
- 35 Souza, L.M., Boone, T.C., Gabrilove, J., Lai, P.H., Zsebo, K.M., Murdock, D.C., Chazin, V.R., Bruszewski, J., Lu, H., Chen, K.K., Barendt, J., Platzer, E., Moore, M.A.S., Mertelsmann, R. y Welte, K. (1986) *Science* 232: 61-65.
- Spivak, J.L., Hogans, B.B. (1989) *Blood* 73: 90-99.
- 40 Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Takashi, D., Hoshi, S., Kochibe, N. y Kotaba, A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 3657-3663.
- Tanaka, H., Satake-Ishikawa, R., Ishikawa, M., Matsuki, S. y Asano, K. (1991) *Cancer Research* 51: 3710-3714.
- 45 Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. y Hamuro, J. (1983) *Nature* 302: 305-310.
- Taniguchi, T., Ohno, S., Fujii-Kuriyama, Y. y Muramatsu, M. (1980) *Gene* 10: 11-15.
- 50 Tarnowski, S.J., Roy, S.K., Liptak, R.A., Lee, D.K. y Ning, R.Y. (1986) *Methods Enzymology* 119: 153-165.
- Tavernier, J., Tuypens, T., Verhee, A., Plaetinck, G., Devos, R., Van Der Heyden, J., Guisez, Y. y Oefner, C. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5194-5198.
- 55 Teh, L.-C. y Chapman, G.E. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 150: 391-398.
- Thatcher, D.R. y Panayotatos, N. (1986) *Methods Enzymology* 119: 166-177.
- 60 Tomas, F.M., Knowles, S.E., Owens, P.C., Chandler, C.S., Francis, G.L., Read, L.C. y Ballard, F.J. (1992) *Biochem. J.* 282: 91-97.
- Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y. y Nagata, S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7633-7637.
- 65 Tsuda, E., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S. y Sasaki, R. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188: 405-411.
- Vieira, P., de Waal-Malefyt, R., Dang, M.N., Johnson, K.E., Kastelein, R., Fiorentino, D.F., de Vries, J.E., Roncarolo, M.-G., Mosmann, T.R. y Moore, K.W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1172-1176.

Wang, A., Lu, S. -D., y Mark, D.F. (1984) *Science* 224: 1431-1433.

Walter, M.R., Cook, W.J., Ealick, S.E., Nagabhusan, T.L., Trotta, P.T. y Bugg, C.E. (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 1075-1085.

Wen, D., Boissel, J.-P. R., Tracy, T.E., Gruninger, R.H., Mulcahy, L.S., Czelusniak, J., Goodman, M. y Bunn, H.F. (1993) *Blood*: 1507-1516.

Wen, D., Boissel, J.P., Showers, M., Ruch, B.C. y Bunn, H.F. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 22839-22846.

White, B. A., (1993), *Methods in Molecular Biology*, volume 15: PCR Protocols: Current Methods y Applications. *Humana Press*, Totowa, NJ.

Wojchowski, D.M., Orkin, S.H., Sytkowshi, A.J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 910: 224-232.

Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., Kelleher, K., Herrmann, S.H., Clark, S.C., Azzoni, L., Chan, S.H., Trinchieri, G. y Perussia, B. (1991) *J. Immunology* 146: 3074-3081.

Wong, G.G. *et al.*, (1987) *Science* 235: 1504.

Wrighton, N.C., Farrell, F.X., Chang, R. *et al.*, (1996) *Science* 273: 458-463.

Yamaguchi, K., Akai, K., Kawanishi, G. Ueda, M., Masuda, S., Sasaki, R. (1991). *J. Biol. Chem.* 266: 20434-20439.

Yang, Y.-C., Ciarletta, A.B., Temple, P.A., Chung, M.P., Kovacic, S., Witek-Giannotti, J.S., Leary, A.C., Kriz, R., Donahue, R.E., Wong, G.G. y Clark, S.C. (1986) *Cell* 47: 3-10.

Yang, Y.-C., Ricciadi, S., Ciarlena, A., Calveti, J., Kelleher, K. y Clark, S.C. (1989) *Blood* 74: 1880-1884.

Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J.E., Lee F. y Arai, K.-I. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5894-5898.

Yokota, T., Coffman, R.L., Hagiwara, H., Rennick, D.M., Takebe, Y., Yokota, K., Gemmell, L., Shrader, B., Yang, G., Meyerson, P., Luh, J., Hoy, P., Pene, J., Briere, F., Spits, H., Banchereau, J., De Vries, J., Lee, F., Arai, N. y Arai, K.-I. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7388-7392.

Zurawski, S.M., Imler, J.L., y Zurawski, G. (1990) *EMBO J.* 9: 3899-3905.

Zurawski, S.M. y Zurawski, G. (1992) *EMBO J.* 11: 3905-3910.

Referencias citadas en la descripción

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

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5206344 A
- US 5166322 A
- WO 9412219 A
- US 9506540 W
- WO 9422466 A
- US 5547933 A, Lin, F.-K
- US 07822296 B
- WO 60052516 A

Literatura no asociada a patentes citada en la descripción

- Current Methods and Applications. *Humana Press*, Inc, 1993
- A Guide to Methods and Applications. *Academic Press* Inc, 1990
- BARIK, S. *Megaprimer Method*, 277-286

ES 2 297 889 T3

- PCR Protocols: Current Methods and Applications. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Inc, 1993, vol. 15
- Gene Splicing by Overlap Extension. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Inc, 1993, vol. 15, 251-261
- **KOSHLAND; BOTSTEIN**. *Cell*, 1980, vol. 20, 749-760
- **HSIUNG et al.** *Bio/Technology*, 1986, vol. 4, 991-995
- **BECKER; HSIUNG**. *FEBS Lett*, 1986, vol. 204, 145-150
- **LEUNG et al.** *Nature*, 1987, vol. 330, 537-543
- **ABDEL-MEGUID, S.S; SHIEH, H.-S; SMITH W.W; DAYRINGER, H.E; VIOLAND, B.N; BENTLE, L.A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 6434-6437
- **ABUCHOWSKI, A; KAZO, G.M; VERHOEST, C.R; VAN ES, T; KAFKEWITZ, D; NUCCI, M.L; VIAU, A.T; DAVIS, F.F.** *Cancer Biochem. Biophys*, 1984, vol. 7, 175-186
- Handbook for Basic and Clinical Research. **AGGARWAL, B.B.** Human Cytokines. *Blackwell Science*, 1998, vol. III
- Handbook for Basic and Clinical Research. **AGGARWAL, B.B; GUTTERMAN, J.U.** Human Cytokines. *Blackwell Scientific Publications*, 1992, vol. I
- Handbook for Basic and Clinical Research. **AGGARWAL, B.B; GUTTERMAN, J.U.** Human Cytokines. *Blackwell Science*, 1996, vol. II
- **ANDERSON, D.M.; JOHNSON, L; GLACCUM, M.B; COPELAND, N.G; GILBERT, D.J; JENKINS, N.A; VALENTINE, V; KIRSTEIN, M.N; SHAPIRO, D.N; MORRIS, S.W.** *Genomics*, 1995, vol. 25, 701-706
- **BAZAN, J.F.** *Science*, 1992, vol. 257, 410-411
- **BECKER, G.W; HSIUNG, H. M.** *FEBS Letters*, 1986, vol. 204, 145-150
- **BILL, RM; WINTER, P.C; MCHALE, C.M; HODGES, V.M; ELDER, G.E; CALEY, J; FLITSCH, S.L.; BICKNELL, R; LAPPIN, T.R.J.** *Biochem. Biophys. Acta*, 1995, vol. 1261, 35-43
- **BITTORF, T; JASTER, R; BROCK, J.** *FEBS Letters*, 1993, vol. 336, 133-136
- **BLATT, L.M; DAVIS, J.M; KLEIN, S.B; TAYLOR, M.W.** *Journal of Interferon and cytokine Research*, 1996, vol. 16, 489-499
- **BOISSEL, J.-P; LEE, W.-R; PRESNELL, S.R.; COHEN, F.E; BUNN, H.F.** *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 15983-15993
- **BUTLER, C.A.** A Paradigm for Success. Lehman Brothers Technical Report, 1996
- **CANTRELL, M.A; ANDERSON, D; CERRETTI, D.P; PRICE, V; MCKEREGHAN, K; TUSHINSKI, R.J; MOCHIZUKI, D.Y; LARSEN, A; GRABSTEIN, K; GILLIS, S.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 82, 6250-6254
- **CERRETTI, D.P et al.** *Molecular Immunology*, 1988, vol. 25, 761
- **CHANG, C.N; REY, B; BOCHNER, B; HEYNEKER, H; GRAY, G.** *Gene*, 1987, 189-196
- **COTES, P.M; BANGHAM, D.R.** *Nature*, 1961, vol. 191, 1065-1067
- **COX, G.N; MCDERMOTT, M.J; MERKEL, E; STROH, C.A; KO, S.C; SQUIRES, C.H; GLEASON, T.M; RUSSELL, D.** *Endocrinology*, 1994, vol. 1 (35), 1913-1920
- **CUNNINGHAM, B.C; WELLS, J.A.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085
- **CUNNINGHAM, B.C; JHWANI, P; NG, P; WELLS, J.A.** *Science*, 1989, vol. 243, 1330-1336
- **CUNNINGHAM, B.C; ULTSCH, M; DE VOS, A.M; MULKERRIN, M.G; CLAUSER, K.R; WELLS, J.A.** *Science*, 1991, vol. 254, 821-825
- **D'ANDREA, A.D; LODISH, H.F; WONG, G.G.** *Cell*, 1989, vol. 57, 277-285

ES 2 297 889 T3

- DAVIS, S; ALDRICH, T.H; STAHL, N; PAN, L; TAGA, T; KISHIMOTO, T; IP, N.Y; YANCOPOULUS, G.D. *Science*, 1993, vol. 260, 1805-1808
- 5 • DECHIARA, T.M; ERLITZ, F; TARNOWSKI, K, S.J. *Methods Enzymology*, 1986, vol. 119, 403-15
- DE LA LIOSA, P; CHENE, N; MARTAL, J. *FEBS Letts*, 1985, vol. 191, 211-215
- 10 • DELORME, E; LORENZINI, T; GIFFIN, J; MARTIN, F; JACOBSEN, F; BOONE, T; ELLIOT, S. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 9871-9876
- DE SAUVAGE, F.J; HASS, P.E; SPENCER, S.D *et al. Nature*, 1994, vol. 369, 533-538
- DE VOS, A.M; ULTSCH, M; KOSSIAKOFF, A.A. *Science*, 1992, vol. 255, 306-312
- 15 • DEVOS, R; PLAETINCK, G; CHEROUTRE, H; SIMONS, G; DEGRAVE, W; TAVERNIER, J; REMAUT, E; FIERS, W. *Nucleic Acids Research*, 1983, vol. 11, 4307
- DIEDERICHS, K; BOONE, T; KARPLUS, A. *Science*, 1991, vol. 154, 1779-1782
- 20 • DORSSERS, L; BURGER, H; BOT, F; DELWEL, R; VAN KESSEL, A.H.M.G; LOWENBERG, B; WAGEMAKER, G. *SCIENCE*, 1987, vol. 55, 115-124
- DUBE, S; FISHER, J.W; POWELL, J.S. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 17526-17521
- 25 • FISH, E.N; BANERJEE, K; LEVINE, H.L; STEBBING, N. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1986, vol. 30, 52-56
- FOSTER, D.C; SPRECHER, C.A; GRANT, F.J; KRAMER, J.M *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1994, vol. 91, 13023-13027
- 30 • FUKUDA, M.N; SASAKI, H; FUKUDA, M. *Blood*, 1989, vol. 73, 84-89
- GOEDEL, D.V; HEYNEKER, H.L; HOZUMI, T. *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 544-548
- 35 • GOEDEL, D.V; YELVERTON, E; ULLRICH, A; HEYNECKER, H.L; MIOZZARI, G; HOLMES, W; SEEBURG, P.H; DULL, T; MAT, L; STEBBING, N. *Nature*, 1980, vol. 287, 411-416
- GOLDWASSER, E; GROSS, M. *Methods Enzymology*, 1975, vol. 37, 109-121
- 40 • GOODSON, R.J; KATRE, N.V. *Biotechnology*, 1990, vol. 8, 343-346
- GOODWIN, R.G; LUPTON, S; SCHMIERER, A; HJERRILD, K.J; JERZY, R; CLEVINGER, W; GILLIS, S; COSMAN, D; NAMEN, A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 302-306
- 45 • GOUGH, N.M *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1988, vol. 85, 2623-2627
- GUBLER, U; CHUA, A.O; SCHOENHAUT, D.S; DWYER, C.M; MCCOMAS, W; MOTYKA, R; NABAVI, N.; WOLITZKY, A.G; QUINN, P.M; FAMILLETTI, P.C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 4143-4147
- 50 • HERSHFIELD, M.S; BUCKLEY, RH; GREENBERG, M.L *et al. N. Engl. J. Medicine*, 1987, vol. 316, 589-596
- HILL, C.P; OSSLUND, T.D; EISENBERG, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5167-5171
- 55 • HOFFMAN, R.C; ANDERSEN, H; WALKER, K; KRAKOVER, J.D; PATEL, S; STAMM, M.R; OSBORN, S.G. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, 14849-14861
- HSIUNG, H.M; MAYNE, N.G; BECKER, G.W. *Biotechnology*, 1986, vol. 4, 991-995
- 60 • HERCUS, T.R; BAGLEY, C.J; CAMBARERI, B; DOTTORE, M; WOODCOCK, J.M; VADAS, M.A; SHANNON, M.F; LOPEZ, A.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 5838-5842
- HIRANO, T; YASUKAWA, K; HARADA, H; TAGA, T; WATANABE, Y; MATSUDA, T; KASHIWAMURA, S.-I; NAKAJIMA, K; KOYAMA, K; IWAMATSU, A. *Nature*, 1986, vol. 324, 73-76
- 65 • HORISBERGER, M.A; DI MARCO, S. *Pharmac. Ther*, 1995, vol. 66, 507-534

ES 2 297 889 T3

- **INNIS, M.A; GELFAND, D.H; SNINSKY, J.J; WHITE, T.J.** PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press*, 1990, vol. 313, 806-810
- **JACOBS, K; SHOEMAKER, C; RUDERSDORF, R** *et al. Nature*, 1985, vol. 313, 806-810
- **KARPUSAS, M; NOLTE, M; BENTON, C.B; MEIER, W; LIPSCOMB, W.N; GOELZ, S.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, 11813-11818
- **KATRE, N.V.** *J. Immunology*, 1990, vol. 144, 209-213
- **KATRE, N.V; KNAUF, M.J; LAIRD, W.J.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 1487-1491
- **KAWASAKI, E.S** *et al. Science*, 1985, vol. 230, 291
- **KAWASHIMA, I.; OHSUMI, J; MITA-HONJO, K; SHIMODA-TAKANO; ISHIKAWA, H; SAKAKIBARA, S; MIYADAI, K; TAKIGUCHI, Y.** *FEBS Letts*, 1991, vol. 283, 199-202
- **KINESLEY, D.M.** *Genes Dev*, 1994, vol. 8, 133-146
- **KOMATSU, N; NAKAUCHI, H; MIWA, A; ISHIHARA, T; EGUGUCHI, M** *et al. Cancer Research*, 1991, vol. 51, 341-348
- **KRUSE, N; TONY, H.-P; SEBALD, W.** *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 3237-3244
- **LAM, A; FULLER, F; MILLER, J; KLOSS, J; MANTHORPE, M; VARON, S; CORDELL, B.** *Gene*, 1991, vol. 102, 271-276
- **KUBOTA, N; ORITA, T; HATTORI, K; OH-EDA, M; OCHI, N; YAMAZAKI, T.** *J. Biochem.*, 1990, vol. 107, 486-492
- **KUGA, T; KOMATSU, Y; YAMASAKI, M; DE4KINE, S; MIYAJI, H; NISHI, T; SATO, M; YOKOO, Y; ASANO, M; OKABE, M.** *Bioch. Biophys. Res. Comm*, 1989, vol. 159, 103-111
- **KUNKEL, T.A; ROBERTS, J.D; ZAKOUR, R.A.** *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 154, 367-382
- **LANGE, B; VALTIERI, M; SANTOLI, D; CARACCILOLO, D; MAVILIO, F; GEMPERLEIN, I; GRIFFIN, C; EMANUEL, B; FINAN, J; NOWELL, P.** *Blood*, 1987, vol. 70, 192-199
- **LEE, F; YOKOTA, T; OTSUKA, T; GEMMELL, L; LARSON, N; LUH, J; ARAI, K.-I.; RENNICK, D.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 4360-4364
- **LEWIS, J.A.** Antiviral activity of cytokines. 1995, 129-141
- **LI, C.H.** *Mol. Cell. Biochem.*, 1982, vol. 46, 31-41
- **LIN, F.-K; SUGGS, S; LIN, C.-H** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 7580-7584
- **LINSLEY, P.S; KALLESTAD, J; OCHS, V; NEUBAUER, M.** *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*, 1990, vol. 10, 1882-1890
- **LIVNAH, O; STURA, E.A; JOHNSON, D.L** *et al. Science*, 1996, vol. 273, 464-471
- **LU, H.S; CLOGSTON, C.L; NARHI, L.O; MEREWETHER, L.A; PEARL, W.R; BOONE, T.C.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 8770-8777
- **LYDON, N.B; FAVRE, C; BORE, S; NEYRET, O; BENUREAU, S; LEVINE, A.M; SEELIG, G.F; NAGABHUSHAN, T. L; TROTTA, P.P.** *Biochemistry*, 1985, vol. 24, 4131-41
- **MACGILLIVRAY, M.H; BAPTISTA, J; JOHNSON, A.** *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 1996, vol. 81, 1806-1809
- **MALIK, N; KALLESTAD, J.C; GUNDERSON, N.L; AUSTIN, S.D; NEUBAUER, M.G; OCHS, V; MARQUARDT, H; ZARLING, J.M; SHOYAB, M; WEI, C.-M.** *Molecular and Cellular Biology*, 1989, vol. 9, 2847-2853
- **MARTIAL, J; CHENE, N; DE LA LLOSA, P.** *FEBS. Letts*, 1985, vol. 180, 295-299
- **MARTIAL, J.A; HALLEWELL, R.A; BAXTER, J.D; GOODMAN, H.M.** *Science*, 1979, vol. 205, 602-606

ES 2 297 889 T3

- **MATTHEWS, D.J; TOPPING, R.S; CASS, R.T; GIEBEL, L.B.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 9471-9476
- **MCKAY, D.B.** *Science*, 1992, vol. 257, 412
- 5 • **MCKENZIE, A.N.J; CULPEPPER, J.A; MALEFYT, R; DE W; BRIERE, F; PUNNONEN, J; AVERSA, G; SATO, A; DANG, W; COCKS, B.G.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 3735-3739
- 10 • **MEYERS, F.J; PARADISE, C; SCUDDER, S.A; GOODMAN, G; KONRAD, M.** *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1991, vol. 49, 307-313
- **MILBURN, M.V; HASSELL, A.M; LAMBERT, M.H; JORDAN, S.R; PROUDFOOT, A.E; GRABER, P; WELLS, T.N.C.** *Nature*, 1993, vol. 363, 172-176
- 15 • **MILLS, J.B.; KOSTYO, J.L; REAGAN, C.R; WAGNER, S.A; MOSELEY, M.H; WILHELM, A.E.** *Endocrinology*, 1980, vol. 107, 391-399
- **MINTY, A; CHALON, P; DEROCQ, J.-M; DUMONT, X; GUILÉMOT, J.-C; KAGHAD, M; LABIT, C; LEPLATOIS, P; LIAUZUN, P; MILOUX, B.** *Nature*, 1993, vol. 362, 248-250
- 20 • **MOREAU, J.-F; DONALDSON, D.D; BENNETT, F; WITEK-GIANNOTTI, J; CLARK, S.C; WONG, G.G.** *Nature*, 1988, vol. 336, 690-692
- **MOTT, H.R; CAMPBELL, I.D.** *Current Opinion in Structural Biology*, 1995, vol. 5, 114-121
- 25 • **MARTIAL, J.A; HALLEWELL, RA; BAXTER, J.D; GOODMAN, H.M.** *Science*, 1979, vol. 205, 602-606
- **NAGATA, S.** Cytokines and Their Receptors. *Oxford University Press*, 1994, 158-160
- 30 • **NAGATA, S; TSUCHIYA, M; ASANO, S; KZIRO, Y; YAMAZAKI, T; YAMAMOTO, O; HIRATA, Y; KUBOTA, N; OH-EDA, M; NOMURA, H.** *Nature*, 1986, vol. 319, 415-418
- **NAGATA, S; TSUCHIYA, M; ASANO, S; YAMAMOTO, O; HIRATA, Y; KUBOTA, N; OH-EDA, M; NOMURA, H; YAMAZAKI, T.** *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 575-581
- 35 • **O'REILLY, D.R; MILLER, L.K; LUCKOW, V.A.** *Caiculovirus Expression Vectors*. W.H. *Freeman Co. publishers*, 1992
- **OTSUKA, T; MIYAJIMA, A; BROWN, N; OTSU, K; ABRAMS, J; SAELAND, S; CAUX, C; DE WAAL-MALEFYT; DE VRIES, J; MEYERSON, P.** *J. Immunology*, 1988, vol. 140, 2288-2295
- 40 • **OWERS-NARHI, L.; ARAKAWA, T; AOKI, K.H; ELMORE, R; ROHDE, M.F; BOONE, T; STRICKLAND, T.W.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 23022-23026
- 45 • **OZES, O.S; REITER, Z; KLEIN, S; BLATT, L.M; TAYLOR, M.W.** *J. Interferon Research*, 1992, vol. 12, 55-59
- **PAONESSA, G; GRAZIANI, R; DE SERIO, A; SAVINO, R; CIAPPONI, L; LAHM, A; SSALVATI, A.L; TONIATTI, C; CILIBERTO, G.** *EMBO J.*, 1995, vol. 14, 1942-1951
- 50 • **PARK, L.S; WALDRON, P.E; FRIEND, D; SASSENFELD, H.M; PRICE, V; ANDERSON, D; COSMAN, D; ANDREWS, R.G; BERNSTEIN, I.D; URDAL, D.L.** *Blood*, 1989, vol. 74, 56-65
- **PAUL, S.R; BENNETT, F; CALVETTI, J.A; KELLEHER, K; WOOD, C.R; O'HARA, R.M; LEARY, A.C; SIBLEY, B; CLARK, S.C; WILLIAM, D.A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 7512-7516
- 55 • **PESTKA, S; LANGER, J.A; ZOON, K.C; SAMUEL, C.E.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, 727-777
- **PICKERING, L.A; KRONENBERG, L.H; STEWART, W.E.** *Proc. Natl. Acad. Scio. USA*, 1980, vol. 77, 5938-5942
- 60 • **POWERS, R; GARRETT, D.S; MARCH, C.J; FRIEDEN, E.A; GRONENBORN, A.M; CLORE, G.M.** *Science*, 1992, vol. 256, 1673-1677
- 65 • **RADHAKRISHNAN, R; WALTER, L.J; HRUKA, A; REICHERT; P; TROTTA, P.P; NAGABHUSHAN,T. L; WALTER, M.R.** *Structure*, 1996, vol. 4,1453-1463

ES 2 297 889 T3

- **READ, L.C; TOMAS, F.M; HOWARTH, G.S; MARTIN, A.A; EDSON, K.J; GILLESPIE, C.M; OWENS, P.C; BALLARD, F.J.** *J. Endocrinology*, 1992, vol. 133, 421-431
- **REDFIELD, C; SMITH L.J; BOYD, J; LAWRENCE, G.M.P; EDWARDS, RG; SMITH, R.A.G; DOBSON, C.M.** *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 11029-11035
- **ROBINSON, R.C; GREY, L.M; STAUTON, D; VANKELECOM, H; VEMALLIS, A.B; MOREAU, J.-F; STUART, D.I; HEATH, J.K.; JONES, E.Y.** *Cell*, 1994, vol. 77, 1101-1116
- **SASAKI, H; BOTHNER, B; DELL, A; FUKUDA, M.** *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 12059-12076
- **SASAKI, H; OCHI, N; DELL, A; FUKUDA, M.** *Biochemistry*, 1988, vol. 27, 8616-8626
- **SHIRAFUJI, N; ASANO, S; MATSUDA, S; WATARI, K; TAKAKU, F; NAGATA, S.** *Exp Hematol*, 1989, vol. 17, 116-119
- **SILVENNOINEN, O.; IHLE, J.N.** Signalling by the Hematopoietic Cytokine Receptors. RG. Landes, Company, 1996
- **SOUZA, L.M; BOONE, T.C; GABRILOVE, J; LAI, PH; ZSEBO, K.M; MURDOCK, D.C; CHAZIN, V.R; BRUSZEWSKI, J; LU, H; CHEN, K.K.** *Science*, 1986, vol. 232, 61-65
- **SPIVAK, J.L; HOGANS, B.B.** *Blood*, 1989, vol. 73, 90-99
- **TAKEUCHI, M; TAKASAKI, S; MIYAZAKI, H; TAKASHI, D; HOSHI, S; KOCHIBE, N; KOTABA, A.** *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 3657-3663
- **TANAKA, H; SATAKE-ISHIKAWA, R; ISHIKAWA, M; MATSUKI, S; ASANO, K.** *Cancer Research*, 1991, vol. 51, 3710-3714
- **TANIGUCHI, T; MATSUI, H; FUJITA, T; TAKAOKA, C; KASHIMA, N; YOSHIMOTO, R; HAMURO, J.** *Nature*, 1983, vol. 302, 305-310
- **TANIGUCHI, T; OHNO, S; FUJII-KURIYAMA, Y; MURAMATSU, M.** *Gene*, 1980, vol. 10, 11-15
- **TARNOWSKI, S.J; ROY, S.K; LIPTAK, R.A; LEE, D.K; NING, R.Y.** *Methods Enzymology*, 1986, vol. 119, 153-165
- **TAVERNIER, J; TUYSENS, T; VERHEE, A; PLAETINCK, G; DEVOS, R; VAN DER HEYDEN, J; GUISEZ, Y; OEFNER, C.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 5194-5198
- **TEH, L.-C; CHAPMAN, G.E.** *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 1988, vol. 150, 391-398
- **THATCHER, D.R; PANAYOTATOS, N.** *Methods Enzymology*, 1986, vol. 119, 166-177
- **TOMAS, F.M; KNOWLES, S.E; OWENS, P.C; CHANDLER, C.S; FRANCIS, G.L; READ, L.C; BALLARD, F.J.** *Biochem. J.*, 1992, vol. 282, 91-97
- **TSUCHIYA, M; ASANO, S; KAZIRO, Y; NAGATA, S.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 7633-7637
- **TSUDA, E; KAWANISHI, G; UEDA, M; MASUDA, S; SASAKI, R.** *Eur. J. Biochem.*, 1990, vol. 188, 405-411
- **VIEIRA, P; DE WAAL-MALEFYT, R; DANG, M.N; JOHNSON, K.E; KASTELEIN, R; FIORENTINO, D.F; DE VRIES, J.E; RONCAROLO, M.-G; MOSMANN, T.R; MOORE, K.W.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1172-1176
- **WANG, A; LU, S. -D; MARK, D.F.** *Science*, 1984, vol. 224, 1431-1433
- **WALTER, M.R; COOK, W.J; EALICK, S.E; NAGABHUSAN, T.L; TROTTA, P.T; BUGG, C.E.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 224, 1075-1085
- **WEN, D; BOISSEL, J.-P. R; TRACY, T.E; GRUNINGER, R.H; MULCAHY, L.S; CZELUSNIAK, J; GOODMAN, M; BUNN, H.F.** *Blood*, 1993, 1507-1516
- **WEN, D; BOISSEL, J.P; SHOWERS, M; RUCH, B.C; BUNN, H.F.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 22839-22846

ES 2 297 889 T3

• PCR Protocols: Current Methods and Applications. **WHITE**, B. A. *Methods in Molecular Biology. Humana Press, 1993*, vol. 15

• **WOJCHOWSKI**, D.M; **ORKIN**, S.H; **SYTKOWSHI**, A.J. *Biochim. Biophys. Acta, 1987*, vol. 910, 224-232

5

• **WOLF**, S.F; **TEMPLE**, P.A; **KOBAYASHI**, M; **YOUNG**, D; **DICIG**, M; **LOWE**, L; **DZIALO**, R; **FITZ**, L; **FERENZ**, C; **HEWICK**, R.M. *J. Immunology, 1991*, vol. 146, 3074-3081

10

• **WONG**, G.G *et al. Science, 1987*, vol. 235, 1504

• **WRIGHTON**, N.C; **FARRELL**, F.X; **CHANG**, R *et al. Science, 1996*, vol. 273, 458-463.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una variante con cisteína de la hormona de crecimiento (ID. SEC. NO: 1), en la que dicha variante comprende las cuatro cisteínas nativas C53, C165, C182 y C189, y en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo que consta de: un aminoácido localizado en el extremo del terminal N del lazo A-B, que corresponde a los aminoácidos 34-52 de la ID. SEC. NO: 1, un aminoácido localizado en el lazo B-C, un aminoácido localizado en el lazo C-D, un aminoácido localizado en los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice A, un aminoácido localizado en los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice B, un aminoácido localizado en los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice C, un aminoácido localizado en los primeros tres o los últimos tres aminoácidos de la hélice D, un aminoácido localizado en los aminoácidos que preceden a la hélice A, y un aminoácido localizado en los aminoácidos que siguen a la hélice D;

15 en la que dicha variante posee la capacidad de provocar *in vitro* la proliferación de una línea celular que prolifera en respuesta a la hormona del crecimiento.

20 2. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo que consta de: F1, T3, P5, E33, A34, K38, E39, Q40, S43, Q46, N47, P48, Q49, T50, S51, A98, N99, S100, G104, A105, S106, E129, D130, G131, S132, P133, T135, G136, Q137, K140, Q141, T142, S144, K145, D147, T148, N149, S150, H151, N152, D153, S184, E186, G187, S188 y G190.

25 3. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en la región de la hormona del crecimiento que precede a la hélice A.

4. La variante con cisteína según la reivindicación 3, en la que un residuo de cisteína sustituye a F1.

5. La variante con cisteína según la reivindicación 3, en la que un residuo de cisteína sustituye a T3.

6. La variante con cisteína según la reivindicación 3, en la que un residuo de cisteína sustituye a P5.

30 7. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en la región de la hormona del crecimiento que sigue a la hélice D.

35 8. La variante con cisteína según la reivindicación 7, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por S184, E186, G187, S188, y G190.

40 9. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en el extremo del terminal N del lazo A-B de la hormona de crecimiento, correspondiente a los aminoácidos 34-52 de la ID. SEC. NO: 1.

45 10. La variante con cisteína según la reivindicación 9, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por A34, K38, E39, Q40, S43, Q46, N47, P48, Q49, T50 y S51.

11. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en el lazo C-D de la hormona de crecimiento.

50 12. La variante con cisteína según la reivindicación 11, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por D130, G131, S132, P133, T135, G136, Q137, K140, Q141, T142, S144, K145, D147, T148, N149, S150, H151, N152 y D153.

13. La variante con cisteína según la reivindicación 11, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por S132, P133, Q137, K140, S144 y T148.

55 14. La variante con cisteína según la reivindicación 11, en la que un residuo de cisteína sustituye a P133.

15. La variante con cisteína según la reivindicación 11, en la que un residuo de cisteína sustituye a S132.

60 16. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en el lazo B-C de la hormona de crecimiento.

17. La variante con cisteína según la reivindicación 16, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por A98, N99, S100, G104, y A105.

65 18. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en la región de la hormona de crecimiento, seleccionado entre el grupo que consta de los primeros tres aminoácidos de la hélice A o los últimos tres aminoácidos de la hélice A.

ES 2 297 889 T3

19. La variante con cisteína según la reivindicación 18, en la que un residuo de cisteína sustituye a E33.

20. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en la región de la hormona de crecimiento, seleccionado entre el grupo que consta de los primeros tres aminoácidos en la hélice B o los últimos tres aminoácidos en la hélice B.

21. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en la región de la hormona de crecimiento, seleccionado entre el grupo que consta de los primeros tres aminoácidos de la hélice C o los últimos tres aminoácidos de la hélice C.

22. La variante con cisteína según la reivindicación 21, en la que un residuo de cisteína sustituye a un aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por S106 y E129.

23. La variante con cisteína según la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende un residuo de cisteína que sustituye a un aminoácido localizado en la región de la hormona de crecimiento, seleccionado entre el grupo que consta de los primeros tres aminoácidos de la hélice D o los últimos tres aminoácidos de la hélice D.

24. La variante con cisteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en la que el residuo de cisteína que sustituye se modifica con un resto reactivo a cisteína.

25. La variante con cisteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 en la que la variante de cisteína se modifica con polietilenglicol (PEG).

26. La variante con cisteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 en la que el residuo de cisteína que sustituye se modifica con polietilenglicol (PEG).

27. Una variante con cisteína de la hormona de crecimiento según una cualquiera reivindicación precedente para su empleo en medicina.

28. Uso de una variante con cisteína de la hormona de crecimiento, como se define en una cualquiera de las Reivindicaciones 1-26, en la preparación de un medicamento para la estimulación del metabolismo del hueso, cartílago o músculo, la estimulación del crecimiento somático durante la infancia, para el tratamiento de la baja estatura que sea resultado de una inadecuación de la hormona de crecimiento y fallo renal en niños, o el tratamiento de la caquexia en pacientes con SIDA o la caquexia asociada a otras enfermedades.

ES 2 297 889 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cox III, George N
 Bolder Biotechnology, Inc.
 5
 <120> Derivados de la Hormona de Crecimiento y Proteínas Relacionadas
 <130> BB0011
 10
 <140> desconocido
 <141> 1998-07-14
 15
 <150> 60/052,516
 <151> 1997-07-14
 <160> 41
 20
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 25
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 1
 Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
 1 5 10 15
 35 Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30
 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 35 40 45
 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
 50 55 60
 45 Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
 85 90 95
 50 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
 100 105 110
 55 Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
 115 120 125
 Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
 130 135 140
 60 Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
 145 150 155 160
 Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
 65 165 170 175
 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

ES 2 297 889 T3

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

<210> 3

<211> 165

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

50 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30
55 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45
60 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60
Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

ES 2 297 889 T3

<400> 5

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

35

<210> 6

<211> 174

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15
 45 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30
 50 Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 35 40 45
 Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60
 55 Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 65 70 75 80
 60 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser

65

ES 2 297 889 T3

				85					90				95			
	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp
				100					105					110		
5																
	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro
			115					120					125			
10	Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala	Phe
		130					135					140				
	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe
	145					150					155					160
15	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro		
					165					170						
	<210> 7															
20	<211> 332															
	<212> PRT															
	<213> <i>Homo sapiens</i>															
25	<400> 7															
	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu
	1				5					10					15	
30	Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val
				20					25					30		
	His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu
35			35					40					45			
	Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu
		50					55					60				
40	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln
	65					70					75					80
	Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln
					85						90				95	
45																
	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu
						100			105					110		
	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe
50			115					120					125			
	Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu
	130						135					140				
55	Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Leu	Cys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala
	145					150					155					160
	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Glu	Leu	Pro	Asn
60					165					170					175	
	Arg	Thr	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg	Thr
				180					185					190		
65	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Lys	Trp	Gln	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Ile

ES 2 297 889 T3

<400> 9

5 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
10 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
10 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
15 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
15 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
20 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
25 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
25 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125
30 Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 10

<211> 152

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 10

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro
1 5 10 15
45 Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp
20 25 30
50 Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln
35 40 45
50 Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln
50 55
55 Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe
65 70 75 80
60 Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile
85 90 95
60 Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr
100 105 110
65 Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg
115 120 125

ES 2 297 889 T3

Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln
 130 135 140

5 Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe
 145 150

<210> 11

<211> 129

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 11

His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
 1 5 10 15

20 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
 20 25 30

Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
 35 40 45

25 Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
 50 55 60

30 Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
 65 70 75 80

Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
 85 90 95

35 Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
 100 105 110

40 Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
 115 120 125

Ser

<210> 12

45 <211> 134

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 12

Met Arg Met Leu Leu His Leu Ser Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Tyr
 1 5 10 15

55 Val Tyr Ala Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu
 20 25 30

Thr Leu Ala Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu
 35 40 45

60 Thr Leu Arg Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr
 50 55 60

65 Glu Glu Ile Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln
 65 70 75 80

ES 2 297 889 T3

Gly Gly Thr Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys
 85 90 95
 5 Tyr Ile Asp Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val
 100 105 110
 Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr
 115 120 125
 10 Glu Trp Ile Ile Glu Ser
 130
 <210> 13
 15 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 13
 Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 25 Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20 25 30
 Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45
 30 Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
 50 55 60
 35 Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80
 Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95
 40 Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110
 Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125
 45 Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
 130 135 140
 50 Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 165 170 175
 55 Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
 180 185 190
 60 Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 Leu Arg Gln Met
 210

65 <210> 14
 <211> 177
 <212> PRT

ES 2 297 889 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

5 Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30 10

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60 15

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95 20

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110 25

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140 30

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175 35

His

40

<210> 15

<211> 144

<212> PRT

45

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

50 Met Leu Leu Ala Met Val Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Cys Ser Val
1 5 10 15

Ala Gly Gln Gly Cys Pro Thr Leu Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe
20 25 30

Leu Ile Asn Lys Met Gln Glu Asp Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser
35 40 45 55

Ala Asn Val Thr Ser Cys Leu Cys Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys
60

60

65

ES 2 297 889 T3

50 55 60

Thr Arg Pro Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr
65 70 75 80

Met Gln Thr Arg Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val
85 90 95

Glu Val Leu Lys Asn Asn Lys Cys Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro
100 105 110

Cys Asn Gln Thr Thr Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu
115 120 125

Leu Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile
130 135 140

<210> 16
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 16

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
35 35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
100 105 110

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
165 170 175

Arg Asn

65 <210> 17
 <211> 199
 <212> PRT

ES 2 297 889 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

5 Met Asn Cys Val Cys Arg Leu Val Leu Val Val Leu Ser Leu Trp Pro
 1 5 10

Asp Thr Ala Val Ala Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser
 20 25 30

10 Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser
 35 40 45

15 Leu Leu Ala Asp Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe
 50 55 60

Pro Ala Asp Gly Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met
 65 70 75 80

20 Ser Ala Gly Ala Leu Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg
 85 90 95

25 Leu Arg Ala Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg
 100 105 110

Arg Ala Gly Gly Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr
 115 120 125

30 Leu Gln Ala Arg Leu Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met
 130 135 140

35 Ser Arg Leu Ala Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Leu Ala Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala
 165 170 175

40 Ile Leu Gly Gly Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu
 180 185 190

Leu Leu Leu Lys Thr Arg Leu
 195

<210> 18

<211> 219

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

55 Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
 1 5 10

Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
 20 25 30

60

65

ES 2 297 889 T3

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110

5 Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125

Gly Arg Phe Asn
 130

10 <210> 20
 <211> 114
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

20 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 20 25 30

25 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 35 40 45

30 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 65 70 75 80

35 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110

40 Thr Ser

<210> 21
 <211> 252
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

50 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

55 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser
 20 25 30

Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu
 35 40 45

60 Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly
 50 55 60

65 Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Glu His Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala
 65 70 75 80

ES 2 297 889 T3

Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu
 85 90 95
 5 Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp
 100 105 110
 10 Leu Glu Gln Arg Leu Pro Lys Ala Gln Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu
 115 120 125
 15 Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu
 130 135 140
 20 Gly Leu Arg Asn Asn Ile Tyr Cys Met Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 25 Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala Gly Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro
 165 170 175
 30 Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala Phe Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys
 180 185 190
 35 Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg Phe Met His Ser Val Gly Arg Val
 195 200 205
 40 Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn Arg Ser Arg Arg His Ser Pro
 210 215 220
 45 His Gln Ala Leu Arg Lys Gly Val Arg Arg Thr Arg Pro Ser Arg Lys
 225 230 235 240
 50 Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly Gln Leu Pro Arg
 245 250
 <210> 22
 <211> 200
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22
 45 Met Ala Phe Thr Glu His Ser Pro Leu Thr Pro His Arg Arg Asp Leu
 1 5 10 15
 50 Cys Ser Arg Ser Ile Trp Leu Ala Arg Lys Ile Arg Ser Asp Leu Thr
 20 25 30
 55 Ala Leu Thr Glu Ser Tyr Val Lys His Gln Gly Leu Asn Lys Asn Ile
 35 40 45
 60 Asn Leu Asp Ser Ala Asp Gly Met Pro Val Ala Ser Thr Asp Gln Trp
 50 55 60
 65 Ser Glu Leu Thr Glu Ala Glu Arg Leu Gln Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 65 70 75 80
 70 Arg Thr Phe His Val Leu Leu Ala Arg Leu Leu Glu Asp Gln Gln Val
 85 90 95
 75 His Phe Thr Pro Thr Glu Gly Asp Phe His Gln Ala Ile His Thr Leu
 100 105 110

ES 2 297 889 T3

Leu Leu Gln Val Ala Ala Phe Ala Tyr Gln Ile Glu Glu Leu Met Ile
 115 120 125
 5 Leu Leu Glu Tyr Lys Ile Pro Arg Asn Glu Ala Asp Gly Met Pro Ile
 130 135 140
 Asn Val Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu Lys Lys Leu Trp Gly Leu Lys
 10 145 150 155 160
 Val Leu Gln Glu Leu Ser Gln Trp Thr Val Arg Ser Ile His Asp Leu
 165 170 175
 15 Arg Phe Ile Ser Ser His Gln Thr Gly Ile Pro Ala Arg Gly Ser His
 180 185 190
 Tyr Ile Ala Asn Asn Lys Lys Met
 195 200
 20
 <210> 23
 <211> 181
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23
 30 Ser Pro Leu Pro Ile Thr Pro Val Asn Ala Thr Cys Ala Ile Arg His
 1 5 10 15
 35 Pro Cys His Asn Asn Leu Met Asn Gln Ile Arg Ser Gln Leu Ala Gln
 20 25 30
 Leu Asn Gly Ser Ala Asn Ala Leu Phe Ile Leu Tyr Tyr Thr Ala Gln
 35 40 45
 40 Gly Glu Pro Phe Pro Asn Asn Leu Asp Lys Leu Cys Gly Pro Asn Val
 50 55 60
 45 Thr Asp Phe Pro Pro Phe His Ala Asn Gly Thr Glu Lys Ala Lys Leu
 65 70 75 80
 Val Glu Leu Tyr Arg Ile Val Val Tyr Leu Gly Thr Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 50 Ile Thr Arg Asp Gln Lys Ile Leu Asn Pro Ser Ala Leu Ser Leu His
 100 105 110
 55 Ser Lys Leu Asn Ala Thr Ala Asp Ile Leu Arg Gly Leu Leu Ser Asn
 115 120 125
 Val Leu Cys Arg Leu Cys Ser Lys Tyr His Val Gly His Val Asp Val
 130 135 140
 60 Thr Tyr Gly Pro Pro Asp Thr Ser Gly Lys Asp Val Phe Gln Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Lys Tyr Lys Gln Ile Ile Ala Val
 165 170 175
 65 Leu Ala Gln Ala Phe
 180

ES 2 297 889 T3

	<210> 24	
	<211> 39	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
10	<400> 24	
	catatgttcc caaccattcc ettatccag	39
15	<210> 25	
	<211> 33	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
25	<400> 25	
	gggggatcct cactagaagc cacagctgcc etc	33
30	<210> 26	
	<211> 39	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
40	<400> 26	
	ccccggatcc gccacatgg atctctggca gctgctgtt	39
45	<210> 27	
	<211> 40	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
55	<400> 27	
	ccccgtcgac tctagagcta taaatacgt agctcttggg	40
60	<210> 28	
	<211> 32	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 297 889 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR

5 <400> 28

cgcgatccg attagaatcc acagctcccc tc

32

10 <210> 29

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR

20 <400> 29

ccccctctag acatatgaag aagaacatcg cattcctgct ggcattctatg ttcgttttct 60
ctatcg 66

25

<210> 30

<211> 65

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR

35

<400> 30

gcattctatgt tcgttttctc tategctacc aacgcttacg cattcccaac cattccotta 60
tccag 65

40

<210> 31

<211> 62

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR

<400> 31

55

gcagtggcac tggctggttt cgctaccgta gcgcaggcct tcccaaccat tcccttatcc 60
ag 62

60 <210> 32

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR

ES 2 297 889 T3

	<400> 32	
	ccccgtcgac acatatgaag aagacagcta tcgcgattgc agtggcactg gctggttc	59
5	<210> 33	
	<211> 36	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
15	<400> 33	
	ctgcttgaag atctgcccac accgggggct gccatc	36
20	<210> 34	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
30	<400> 34	
	gtagcgcagg ccttccaac catt	24
35	<210> 35	
	<211> 39	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
45	<400> 35	
	ctgcttgaag atctgcccag tccgggggca gccatcttc	39
50	<210> 36	
	<211> 51	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
60	<400> 36	
	gggcagatct tcaagcagac ctacagcaag ttcgactgca actcacaaa c	51
65	<210> 37	
	<211> 34	

ES 2 297 889 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
	<400> 37	
10	cgcggtacc gggatccgat tagaatccac agct	34
	<210> 38	
15	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
	<400> 38	
25	ggcgagatct tcaagcagac ctactgcaag ttcgac	36
	<210> 39	
30	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
	<400> 39	
40	cgcggtaccg gatccttagc agaagccaca gctgccctcc ac	42
	<210> 40	
45	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	
	<400> 40	
55	gtagcgcagg ccttccaac catt	24
	<210> 41	
60	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador de PCR	

ES 2 297 889 T3

<400> 41

ccccgtcgac tctagagcca ttagatacaa agctcttggg

40

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65