



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 152**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06816409 .4**

96 Fecha de presentación : **04.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1931704**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

54 Título: **Producción y purificación de IL-29.**

30 Prioridad: **04.10.2005 US 723544 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2011

73 Titular/es: **ZYMOGENETICS, L.L.C.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

72 Inventor/es: **Zamost, Bruce, L.;**
Lee, Geoffrey, F. y
Dedinsky, Robert, M.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 357 152 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

[0001] La creciente disponibilidad e identificación de genes procedentes de genomas humanos y otros ha conducido a una creciente necesidad de una expresión y purificación eficaces de proteínas recombinantes. La expresión de proteínas en bacterias es de manera remarcable el enfoque más ampliamente usado para la producción de genes clonados. Por muchas razones, se prefiere la expresión en bacterias a la expresión en células eucariotas. Por ejemplo, es mucho más fácil hacer crecer bacterias que células eucariotas. Más específicamente, la disponibilidad de una abundancia de sofisticadas herramientas genéticas moleculares y de miles de mutantes hacen de *E. coli*, como hospedador de expresión, extremadamente útil para la producción de proteínas. Sin embargo, ha sido a menudo difícil obtener un elevado nivel de producción de proteínas funcionales en *E. coli*, especialmente de aquellas procedentes de fuentes eucariotas.

[0002] IL-28A, IL-28B, e IL-29 comprenden una nueva familia de proteínas recientemente descubierta que tienen homología de secuencias con interferones de tipo I y homología genómica con IL-10. Esta nueva familia se describe completamente en la solicitud PCT de titularidad compartida WO 02/086087 y en Sheppard y col., Nature Immunol. 4: 63-68, 2003. Funcionalmente, IL-28A, IL-28B e IL-29 asemejan INF de tipo I en su capacidad de inducir un estado antivírico en células, pero, a diferencia de los IFN de tipo I, no muestran actividad antiproliferativa frente a algunas líneas de linfocitos B.

[0003] Se ha producido IL-29 recombinante en células procariotas, en particular en *E. coli*. La proteína bacteriana resultante producida no está glicosilada, y se produce en un estado agregado. La producción de IL-29 a partir de *E. coli* requiere que las proteínas agregadas se solubilizan a partir de cuerpos de inclusión insolubles y renaturalizados o replegados. Sin la renaturalización, la actividad específica de la proteína recombinante se verá significativamente reducida.

[0004] A pesar de los avances en la expresión de proteínas recombinantes en hospedadores bacterianos, existe una necesidad de procedimientos mejorados para producir proteínas IL-29 recombinantes biológicamente activas y purificadas en sistemas procariotas que den como resultado mayores rendimientos de producción de proteínas. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras referencia a la siguiente descripción detallada.

[0005] El documento WO 2005/023862 describe preparaciones homogéneas de IL-29.

[0006] El documento CN 1670033 describe un procedimiento para preparar IL-29 humana, y una cepa genomanipulada de IL-29 recombinante.

[0007] Sheppard P. y col., Nature Immunology, Vol. 4(1), enero de 2003, páginas 63-68, describen IL-28, IL-29 y su receptor de citocinas de clase II IL28R.

[0008] En la memoria descriptiva que sigue, se usan ampliamente numerosos términos. Se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la invención.

[0009] A no ser que se especifique de otra forma, “un”, “uno”, “el” y “al menos uno” se usan indistintamente y significan uno o más de uno.

[0010] Según se usa en el presente documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fragmentos generados mediante

cualquier ligadura, escisión, acción de endonucleasa, y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros, que son nucleótidos que se producen naturalmente (tales como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos que se producen naturalmente (*por ejemplo*, formas α -enantioméricas de nucleótidos que se producen naturalmente), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcares y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, sustitución de uno o más grupos hidroxilo por halógenos, grupos alquilo, aminas, y grupos azida, o se pueden funcionalizar azúcares como éteres o ésteres. Además, se puede sustituir el resto azúcar completo con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Entre los ejemplos de modificaciones en el resto base se incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Se pueden unir monómeros de ácido nucleico mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Entre los análogos de enlaces fosfodiéster se incluyen fosfortioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoanilidato, fosforoamidato, y similares. El término “molécula de ácido nucleico” incluye también los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácidos nucleicos que se producen naturalmente o modificadas unidas a un esqueleto de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser tanto monocatenarios como bicatenarios.

[0011] La expresión “complemento de una secuencia de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia.

[0012] Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficacia de la transcripción, con respecto a la distancia o a la orientación del potenciador con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

[0013] “ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN, o a una población de moléculas de ADN que no existe naturalmente en una célula hospedadora dada. Las moléculas de ADN heterólogo de una célula hospedadora particular pueden contener ADN derivado de las especies de células hospedadoras (es decir, ADN endógeno) siempre que el ADN del hospedador esté combinado con ADN no hospedador (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no hospedador que codifica un polipéptido unido de manera operable con un segmento de ADN hospedador que comprende un promotor de la transcripción se considera que es ADN heterólogo si la molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen natural.

[0014] El término “contig” denota una molécula de ácido nucleico que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria con otra molécula de ácido nucleico. Se dice que las secuencias contiguas se “solapan” en un tramo dado de una molécula de ácido nucleico bien en su totalidad o a lo largo de un tramo parcial de la molécula de ácido nucleico.

[0015] “ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenario que está formado a partir de una plantilla de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Normalmente, se emplea un cebador complementario con las porciones de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los expertos en la técnica usan el término “ADNc” para referirse a una molécula de ADN bicatenario constituida por dicha molécula de ADN monocatenario y su cadena de ADN complementario. El término “ADNc” se refiere también a un clon de una

molécula de ADNc sintetizada a partir de una plantilla de ARN.

[0016] Una “molécula de ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico es una molécula de ADN aislado. Otro ejemplo de una molécula
5 de ADN aislado es una molécula de ácido nucleico químicamente sintetizado que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular es más pequeñas que la molécula de ADN completo de un cromosoma de esta especie.

[0017] “ADN lineal” denota moléculas de ADN no circular con extremos 5’ y 3’ libres. Se puede preparar ADN lineal a partir de moléculas cerradas de ADN circular, tales como plásmidos, mediante digestión enzimática o
10 perturbación física.

[0018] Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente un promotor se localiza en la región 5’ no codificante de un gen, próximo al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de la secuencia dentro de los promotores que funcionan en el inicio de la transcripción se caracterizan a menudo por secuencias de nucleótidos consenso. Estos promotores
15 incluyen “promotores inducibles”, por ejemplo, pero sin limitarse a, promotores inducibles por IPTG (tales como promotores *tac*; promotores *trc*; promotores *lac*, promotores de los bacteriófagos T7, T3, T5; y promotores *nprM-lac*), promotores *trp*, promotores *phoA*, promotores *recA*, promotores *cspA*, promotores *tetA*, y bacteriófago λ_{pL} , véase Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. La adición de un “agente de inducción”, por ejemplo isopropil tiogalactopiranosido (IPTG) a un
20 promotor inducible por IPTG, inducirá la expresión del gen o genes bajo el control del promotor inducible por IPTG. Un promotor típico tendrá tres componentes, constituidos por secuencias consenso en -35 y -10 con una secuencia de entre 16 y 19 nucleótidos entre ellos (Lisset, S. y Margalit, H., Nucleic Acids Res. 21: 1512, 1993). Los promotores de este tipo incluyen los promotores *lac*, *trp*, *trp-lac (tac)* y *trp-lac (trc)*. Si un promotor es un promotor inducible, entonces, la velocidad de transcripción aumenta e la respuesta a un agente de inducción. Por el contrario,
25 la velocidad de la transcripción no está regulada por un agente de inducción si el promotor es un promotor constitutivo. Se conocen también promotores represibles.

[0019] Un “promotor central” contiene las secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor, que incluyen el inicio de la transcripción. Según esta definición, un promotor central puede tener o no actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica
30 de tejido.

[0020] Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador eucariota puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares permitiendo la transcripción exclusiva o preferentemente en células, tejidos u órganos particulares. Estos tipos de elementos reguladores se asocian normalmente con genes que se expresan de una
35 manera “específica de célula”, “específica de tejido”, o “específica de órgano”. Los promotores bacterianos tienen elementos reguladores que se unen y modulan la actividad del promotor central, tales como secuencias operadoras que se unen a moléculas activadoras o represoras.

- [0021]** Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido, o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse autónomamente en una célula hospedadora. Los vectores de clonación contienen normalmente uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para uso en la identificación y selección de las células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores incluyen normalmente genes que proporcionan resistencia a un antibiótico.
- [0022]** Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula hospedadora. Normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen, un origen de replicación, un marcador seleccionable, y un terminador de la transcripción. La expresión del gen se coloca normalmente bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen se “une de manera operable con” el promotor. Similarmente, un elemento regulador y un promotor central se unen de manera operable si el elemento regulador modula la actividad del promotor central. Se puede conocer también un vector de expresión como una construcción de expresión.
- [0023]** Un “hospedador recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heterólogo, tal como un vector de clonación o un vector de expresión.
- [0024]** El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en el ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.
- [0025]** El término “secuencia señal secretora” denota una secuencia de ADN que codifica un péptido (“un péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en la que se ha sintetizado. El polipéptido más grande se escinde habitualmente para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.
- [0026]** Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, producidos tanto de manera natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan habitualmente como “péptidos”.
- [0027]** Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína puede comprender también componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Se pueden añadir carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos a una proteína. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de sus estructuras del esqueleto de aminoácidos; sustituyentes tales como grupos carbohidrato y grupos no peptídicos no están generalmente especificados, pero pueden aun así estar presentes.
- [0028]** Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no hospedador es un péptido o polipéptido “heterólogo”.
- [0029]** Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que esta esencialmente exento de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Normalmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en forma muy purificada, es decir, al menos aproximadamente un 80% de pureza, al menos aproximadamente un 90% de pureza, al menos

aproximadamente un 95% de pureza, o más de un 99% de pureza. Una forma de mostrar que una preparación de proteína concreta contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una banda individual tras la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS) de la preparación de proteína y la tinción del Azul Brillante de Coomasie del gel. Sin embargo, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo
5 polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros, o formas alternativamente glicosiladas o derivatizadas.

[0030] Los términos “extremo amino” o extremo N” y “extremo carboxilo” o “extremo C” se usan en el presente documento para denotar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción de un polipéptido particular para denotar proximidad o posición
10 relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia ubicada en el extremo carboxilo respecto de una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se sitúa próxima al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

[0031] Una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias de nucleótidos de al menos dos genes.

15 **[0032]** El término “etiqueta de afinidad” se usa en el presente documento para denotar un segmento de polipéptido que se puede unir a un segundo polipéptido para facilitar la purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En lo principal, se puede usar como etiqueta de afinidad cualquier péptido o proteína de la cual esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico. Las etiquetas de afinidad incluyen un tramo de poli-histidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4:
20 1075 (1985); Nilsson y col., Methods Enzymol. 198: 3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31 (1988)), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp y col., Biotechnology 6: 1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina, u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Están disponibles de proveedores comerciales moléculas de ADN que codifican etiquetas de afinidad (por ejemplo,
25 Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

[0033] El término “isotónico” se usa en el presente documento por su significado convencional, que es una tonicidad igual a la de la sangre, equivalente a una disolución al 0,9% de NaCl. “Una cantidad isotónica” de una sal es la cantidad requerida para preparar una disolución isotónica o para producir una disolución isotónica tras la reconstitución de una preparación liofilizada.

30 **[0034]** En el presente documento las concentraciones se especifican en unidades de molaridad o % en p/v de composiciones líquidas. Cuando la composición está en forma de polvo liofilizado, las concentraciones de los respectivos componentes serán tales que proporcionen la composición especificada tras la reconstitución del polvo.

[0035] Debido a la imprecisión de los procedimientos analíticos normalizados, se entiende que los pesos y las longitudes moleculares de los polímeros son valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como “alrededor
35 de” X o “aproximadamente” X, se entenderá que el valor definido de X tiene una precisión de $\pm 10\%$.

[0036] La memoria descriptiva describe un vector de expresión para producir un polipéptido de IL-29 que comprende elementos unidos de manera operable de un origen de replicación procariota, un elemento de ADN de

inicio de la transcripción, y una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEQS ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 y un terminador de la transcripción. En otro aspecto, el vector de expresión es el vector pTAP440 o pTAP395. Opcionalmente, el vector de expresión puede incluir adicionalmente un marcador seleccionable, tal como kanamicina.

5 **[0037]** La presente memoria descriptiva describe células hospedadoras procariotas transformadas con vectores de expresión que comprenden una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de IL-29 (por ejemplo, Las SEQS ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, y los mutantes biológicamente activos, el vector pTAP440 o el vector pTAP395. En otras realizaciones, la cepa hospedadora es la cepa W3110, zGOLD1, o zGOLD5 de *E. coli*.

[0038] En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos (según se define en las
10 reivindicaciones) para producir un polipéptido de IL-29 en condiciones en las que se exprese el polipéptido de IL-29. El procedimiento comprende cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según un polipéptido seleccionado entre el grupo constituido por las SEQS ID NO: 2, 4 o 6, según se define en las reivindicaciones. El procedimiento comprende también recuperar las células hospedadoras del medio de crecimiento, y a continuación aislar el polipéptido de IL-29 de las células
15 hospedadoras, según se define en las reivindicaciones.

[0039] En otros aspectos, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido de IL-29 que comprende las etapas según se ha descrito anteriormente, en un proceso de fermentación de lecho discontinuo o en un proceso de fermentación discontinuo.

[0040] La presente invención proporciona también procedimientos de producción de un polipéptido de IL-29
20 que comprende cultivar una célula hospedadora (según se define en las reivindicaciones) en un medio de crecimiento adecuado en un matraz con agitación hasta una densidad óptica (DO) entre 5 y 20 a 600 nm, inoculando un recipiente de fermentación con de 1 a 5% v/v (por ejemplo, 1% v/v y 2% v/v) de medio de matraz de agitación que contiene células hospedadoras, cultivando las células hospedadoras en un medio de crecimiento a un pH de 6,2 a 7,2 (por ejemplo, pH 6,8), en el que se alimenta una solución de alimentación al reactor de fermentación transcurrido
25 un tiempo de fermentación (EFT) de 6 a 8 horas, añadir un agente de inducción al reactor de fermentación en un EFT de 20 a 30 horas (por ejemplo, 24 horas), y cosechar las células hospedadoras en un EFT de 48 a 56 horas. En una realización, el agente de inducción es isopropil tiogalactopiranosido (IPTG) a 0,5 a 2 mM (por ejemplo, 1 mM). La disolución de alimentación comprende un carbohidrato, por ejemplo, glicerol y glucosa, y la alimentación puede ser de 10 a 30 gramos/litro (g/l) (por ejemplo, 10-20 g/l) de carbohidrato por hora. En otra realización, el glicerol en la
30 disolución de alimentación es del 40 a 70 v/v en % de glicerol (por ejemplo, 50% p/v) o la glucosa es 40 a 70% p/v (por ejemplo 50% p/v). En realizaciones adicionales, el glicerol es aproximadamente del 70% v/v o la glucosa es aproximadamente del 60% p/v.

[0041] La memoria descriptiva describe procedimientos de producción de un polipéptido de IL-29 que comprenden sembrar un matraz con un inóculo que comprende células hospedadoras de *E. coli* W3110, ZGold1, o
35 ZGold5 que expresan un polipéptido de IL-29 seleccionado entre el grupo constituido por las SEQS ID NO: 2, 4 o 6 o una célula hospedadora de *E coli* W3110, ZGold1, o ZGold5 que comprende un vector pTAP440 o pTAP395, en el que se expresa un polipéptido de IL-29, y con un medio de crecimiento que comprende aproximadamente 5 a 7 g/l

de glicerol o glucosa, cultivar el inóculo en un medio de crecimiento durante 16 a 20 horas a aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C, transferir el inóculo cultivado en el medio de crecimiento a un fermentador discontinuo a una concentración de 1 a 5% v/v de inóculo (por ejemplo, 1 a 2% v/v), fermentar la fermentación discontinua a aproximadamente 37°C y aproximadamente un pH de 6,8 con aproximadamente 10 a 30 g/l (por ejemplo, 10 a 20
5 g/l) de glicerol o glucosa, introducir un alimento de glucosa en aproximadamente 6 a 8 horas de EFT de aproximadamente 5 a 15 gramos de glucosa o glicerol por litro por hora y continuar hasta la finalización del transcurso de la fermentación, añadir IPTG en aproximadamente 24 horas de EFT hasta una concentración final de 0,5 a 2 mM (por ejemplo, 1 mM), fermentando 20 a 30 horas más (por ejemplo, 24 horas), cosechar el caldo de fermentación del fermentador, añadir un volumen igual de agua al caldo de fermentación, y homogeneizar y
10 centrifugar para recoger un residuo de células o una suspensión de células que comprende material de proteína IL-29.

[0042] La memoria descriptiva describe procedimientos para aislar un polipéptido de IL-29 que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEQS ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, y los mutantes biológicamente activos que comprenden separar el polipéptido de IL-29 insoluble en agua de un
15 aglomerado o suspensión celular, disolviendo el material de IL-29 insoluble en un disolvente caótropro, diluir el disolvente caótropro y replegar el polipéptido de IL-29; y aislar el polipéptido de IL-29, en el que el polipéptido de IL-29 aislado es capaz de ser biológicamente activo. En una realización de la invención, el polipéptido de IL-29 aislado es al menos un 90% puro. En otras realización, el polipéptido de IL-29 aislado es al menos un 90 % puro y tiene un nivel de endotoxina de menos de 10 unidades de endotoxina por mg de polipéptido de IL-29 en un ensayo de lisado
20 de amebocitos de *Limulus* basado en USP <85>

[0043] La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para aislar un polipéptido de IL-29 insoluble que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEQS ID NO; 2, 4, 6, 8, 10, 12, y los mutantes biológicamente activos que comprende separar de un caldo de fermentación un residuo de células o una suspensión de células que comprende un material de polipéptido de IL-29
25 insoluble en agua, homogeneizar el residuo de células o la suspensión de células para recoger los cuerpos de inclusión, disolver el material de polipéptido de IL-29 insoluble en un disolvente caótropro que comprende una sal de guanidina, diluir el disolvente caótropro mediante la adición de un tampón de repliegue que comprende sales de arginina y una mezcla de componentes reductores y oxidantes, aislar el polipéptido de IL-29 eliminando las proteínas no plegadas y agregadas filtrando, y purificando el polipéptido de IL-29 replegado en una columna de intercambio
30 catiónico, en la que el IL-29 aislado y purificado es capaz de ser biológicamente activo.

[0044] La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para aislar un polipéptido de IL-29 insoluble que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEQS ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, y los mutantes biológicamente activos que comprende separar de un caldo de fermentación un residuo de células o una suspensión de células que comprende un material de IL-29 insoluble en
35 agua, homogeneizar el residuo de células o la suspensión de células para recoger los cuerpos de inclusión, disolver el material de proteína IL-29 insoluble en un disolvente caótropro que comprende una sal de guanidina, diluir el disolvente caótropro mediante la adición de un tampón de repliegue que comprende sales de arginina y una mezcla

de componentes reductores y oxidantes, aislar el polipéptido de IL-29 eliminando las proteínas no plegadas y agregadas filtrando, y purificando el polipéptido de IL-29 replegado en una columna de intercambio catiónico, y purificar el eluato de IL-29 en una columna de interacción hidrófoba, en la que el polipéptido de IL-29 aislado y purificado es capaz de ser biológicamente activo.

5 **[0045]** La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para aislar un polipéptido de IL-29 insoluble que comprende una secuencia de restos de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEQS ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, y los mutantes biológicamente activos que comprende separar de un caldo de fermentación un residuo de células o una suspensión de células que comprende un material de polipéptido de IL-29 insoluble en agua, homogeneizar el residuo de células o la suspensión de células para recoger los cuerpos de
10 inclusión, disolver el material de polipéptido de IL-29 insoluble en un disolvente caótopo que comprende clorhidrato de guanidina aproximadamente 6 M, ditioneitol 40 mM (DTT) durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente, replegar los cuerpos de inclusión disueltos en una disolución diluyendo en el tampón de repliegue que comprende DTT aproximadamente 2 mM, un par de oxidación-reducción de cistina 4 mM al menos 20 veces, ajustar el pH a aproximadamente 5,5 con ácido acético aproximadamente al 20% y dejar que reaccione la disolución
15 durante al menos cinco horas, diluir la disolución con aproximadamente 1 + 1,4 volúmenes de acetato 25 mM, pH 5,5, filtrar la disolución, introducir la disolución en una columna de resina Tosohaas SP-550C equilibrada a pH 5,5 usando tampón de acetato de sodio, lavar la columna de resina con cloruro de sodio aproximadamente 2 M, lavar la columna de resina con cloruro de sodio aproximadamente 0,6 M para eluir el polipéptido de IL-29 unido, añadir sulfato de amonio a una concentración de aproximadamente 1,5 M para el eluato y filtrar la disolución del eluato,
20 introducir la disolución del eluato en una columna Tosohaas butilo 650-M equilibrada con sulfato de amonio 1,5 M, cloruro de sodio 0,05 en tampón de acetato de sodio, diluir el eluato en una columna HP de SP Sepharose equilibrada con tampón de acetato de sodio, lavar la columna con 20 volúmenes de columna de un gradiente lineal de cloruro de sodio 0,3 a 0,7 M, contraer la proteína IL-29, e intercambiar el tampón por el tampón de formulación usando la ultrafiltración de flujo tangencial.

25 **[0046]** La presente invención proporciona también procedimientos (según se define en las reivindicaciones) para unir covalentemente un polietilenglicol (PEG) con un polipéptido de IL-29 purificado. El PEG se puede unir al extremo N o al C del polipéptido de IL-29. El PRG puede ser metoxiPEG-propionaldehído de 20 kDa. La presente invención proporciona también la purificación del IL-29 mono-PEGilado.

[0047] La presente invención proporciona también un procedimiento (según se define en las reivindicaciones)
30 de producción de un polipéptido de IL-29 que comprende (a) cultivar una célula hospedadora procarionta que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-29 unido de manera operable a un promotor inducible en un primer medio de crecimiento en condiciones en las que el polipéptido de IL-29 codificado se expresa en un matraz con agitación a una DO600 de 5 a 20; (b) inocular un reactor de fermentación con de 1 a 5% v/v de medio de matraz con agitación que contiene células hospedadoras; (c) cultivar las células hospedadoras
35 en un segundo medio de crecimiento a un pH de 6,2 a 7,2, en el que una solución de alimentación de carbohidratos se alimenta en el reactor de fermentación en 6 a 8 horas de tiempo de fermentación transcurrido; (d) añadir un agente de inducción al reactor de fermentación transcurridos de 20 a 30 horas de tiempo de fermentación ; y (e)

cosechar las células hospedadoras procariotas transcurridas de 48 a 56 horas de tiempo de fermentación. Opcionalmente, la solución de alimentación de carbohidratos puede comprender un glicerol o glucosa a una concentración de 10 a 30 g/l del medio de crecimiento, y una velocidad de alimentación de 5-15 gramos de glicerol o glucosa por litro por hora. La célula hospedadora procariota puede ser *Escherichia coli*, tal como, por ejemplo, W3110, ZGOLD1, y ZGOLD5. Adicionalmente, la células hospedadora procariota, por ejemplo, *Escherichia coli* es *ompT* deficiente y/o *fhuA* deficiente. El polipéptido de IL-29 codificado incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de las SEQS ID NO: 2, 4 y 6. El agente de inducción de la etapa (d) puede ser isopropil tiogalactopiranosido, que se puede añadir al cultivo a una concentración de 0,5 mM a 2 mM.

[0048] La presente invención proporciona también un procedimiento (según se define en las reivindicaciones) de recuperación de un polipéptido de IL-29 de una célula hospedadora procariota (según se define en las reivindicaciones) que comprende (a) cultivar la célula hospedadora procariota que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-29 (según se define en las reivindicaciones) unido de manera operable a un promotor inducible en medio de crecimiento en condiciones en las que se exprese el polipéptido de IL-29 codificado; (b) añadir un agente de inducción para inducir la expresión del polipéptido de IL-29; (c) cosechar las células hospedadoras procariotas; (d) lisar las células hospedadoras procariotas; (e) centrifugar las células hospedadoras procariotas lisadas; (f) recuperar el residuo de cuerpos de inclusión; (g) solubilizar el residuo de cuerpos de inclusión en clorhidrato de guanidina 4-6 M y ditiotreitól 10-50 mM durante 1-2 horas a 15-25°C; y (h) añadir el polipéptido de IL-29 solubilizado a un tampón de repliegue que comprende polietilenglicol al 0,05-0,5%, sal, arginina 0,5 M – 1,25 M y una mezcla de moléculas oxidadas y reducidas durante 1-26 horas a una temperatura de 4-30°C y a un pH de 7,3-8,5, en el que el polipéptido de IL-29 se repliega; (i) detener rápidamente la reacción de repliegue ajustando el pH a 5,5-6,5; (j) diluir la disolución replegada rápidamente 1,5 a 10 veces en agua o tampón de baja fuerza iónica a pH 5-7; y (k) filtrar la disolución de repliegue diluida rápidamente mediante filtros para eliminar el precipitado o la materia particulada. Las células hospedadoras procariotas de la etapa (d) se pueden lisar mediante homogeneización. Las células hospedadoras procariotas lisadas de la etapa (e) se pueden centrifugar mediante tanto centrifugación discontinua como continua. Se puede añadir el polipéptido de IL-29 de la etapa (h) al tampón de repliegue hasta una concentración final de 0,05-3,0 mg/ml. La mezcla de moléculas reducidas y oxidadas del tampón de pliegue de la etapa (h) puede ser de moléculas seleccionadas entre el grupo de la cisteína y la cistina, ditiotreitól y cistina, glutatión reducido y glutatión oxidado, y ditiotreitól y glutatión oxidado. La presente memoria descriptiva describe un polipéptido de IL-29 producido y/o recuperado mediante los procedimientos que se describen en el presente documento.

[0049] La presente invención proporciona también un procedimiento de purificación de un polipéptido de IL-29 que comprende (a) proporcionar el polipéptido de IL-29 según la etapa (k) anterior; (b) introducir la disolución filtrada que comprende el polipéptido de IL-29 replegado de la etapa (a) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico equilibrada con acetato de sodio a pH 5,5; (c) eluir el polipéptido de IL-29 unido con cloruro de sodio en acetato de sodio, pH 5,5, y (d) ajustar el eluato con sulfato de amonio a una concentración de 1 M, y pasar el eluato del polipéptido de IL-29 ajustado a través de un filtro de 0,45 µM. Opcionalmente, el polipéptido de IL-29 se puede eluir de la columna de intercambio catiónico para formar un combinado en cloruro de sodio aproximadamente

0,7 M – 0,8 M tras usar una elución en gradiente lineal de cloruro de sodio 0-2 M. En otro aspecto, en la purificación de un polipéptido de IL-29 el procedimiento puede comprender además (e) introducir el polipéptido de IL-29 de la etapa (d) en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba equilibrada con acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 5,5; (f) eluir el polipéptido de IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M a acetato de sodio 50 mM sin sulfato de amonio, pH 5,5; (g) diluir el eluato con agua o tampón de baja fuerza iónica aproximadamente 6 veces y pasar el eluato del polipéptido de IL-29 diluido a través de un filtro de 0,2 µm o 0,45 µm. Opcionalmente, el polipéptido de IL-29 se puede eluir de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba en sulfato de amonio aproximadamente 0,75 M a sulfato de amonio 0 M. En otro aspecto en la purificación de un polipéptido de IL-29, el procedimiento puede comprender incluso además (h) introducir el polipéptido de IL-29 de la etapa (g) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento equilibrada con acetato de sodio 50 mM que comprende cloruro de sodio 0-200 mM, pH 5,5; e (i) eluir el polipéptido de IL-29 con una concentración mayor de cloruro de sodio en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, en una etapa o formato de elución en gradiente. Opcionalmente, el polipéptido de IL-29 puede eluir de la columna de intercambio catiónico de alto rendimiento en cloruro de sodio aproximadamente 0,4 M a cloruro de sodio 0,6 M usando un gradiente de elución de cloruro de sodio 300 a 800 mM. El polipéptido de IL-29 puede tener al menos un 98% de pureza mediante el análisis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y los agregados pueden ser menos del 0,2% mediante la HPLC de exclusión por tamaño. La presente memoria descriptiva describe un polipéptido de IL-29 producido y/o recuperado y/o purificado mediante los procedimientos que se describen en el presente documento.

[0050] La presente invención proporciona también un procedimiento de concentración de un polipéptido de IL-29 purificado que comprende (a) proporcionar un polipéptido de IL-29 purificado según se describe en el presente documento; (b) añadir el polipéptido de IL-29 a una placa de filtración en flujo tangencial y a un sistema de soporte que comprende una o más membranas de corte de pesos moleculares de 3-10 kDa; (c) aplicar una presión transmembrana de 15-25 psi (103,4-172,4 kPa) al sistema para ultrafiltrar la disolución a una concentración mayor; y (d) filtrar el polipéptido de IL-29 concentrado a través de una membrana de 0,2 µm. El polipéptido de IL-29 puede tener al menos un 98% de pureza mediante el análisis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y los agregados pueden ser menos del 0,2% mediante la HPLC de exclusión por tamaño. El polipéptido de IL-29 puede tener un nivel de endotoxinas de menos de 10 unidades de endotoxina por miligramo de polipéptido de IL-29 en un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* basado en USP <85>. La presente invención proporciona también un polipéptido de IL-29 producido y/o recuperado y/o purificado y/o concentrado mediante los procedimientos que se describen en el presente documento.

[0051] La presente invención proporciona también un procedimiento de monopegilación de un polipéptido de IL-29 que comprende (a) proporcionar 3-5 g/l de polipéptido de IL-29 en una solución tampón de acetato de sodio; (b) añadir cianoborohidruro de sodio 10-20 mM a la disolución de la etapa (a); (c) añadir un exceso molar de 2 veces de polietilenglicol derivatizado a la disolución de la etapa (b); y (d) mezclar la disolución de la etapa (c) durante 10-18 horas a 16-20°C. Opcionalmente, el polipéptido de IL-29 monopegilado puede estar al menos un 99% monopegilado según se midió mediante la HPLC en fase inversa. La presente memoria descriptiva describe polipéptidos de IL-29

monopegilados producidos mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

[0052] La presente invención proporciona también un procedimiento de purificación de un polipéptido de IL-29 monopegilado que comprende (e) proporcionar un polipéptido de IL-29 monopegilado según se describe en el presente documento, (f) diluir la disolución de la etapa (e) 2 veces con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5; (g) filtrar la disolución de la etapa (f) a través de una membrana de 0,2 µm; (h) introducir la disolución de la etapa (g) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento equilibrada con acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 5,5; (i) eluir el polipéptido de IL-29 monopegilado de la columna de cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,5, (j) añadir el polipéptido de IL-29 monopegilado a una placa de filtración en flujo tangencial y a un sistema de soporte que comprende una o más membranas de corte de pesos moleculares de 3-10 kDa; (k) aplicar una presión transmembrana de 15-25 psi al sistema para ultrafiltrar la disolución a una concentración mayor; (l) usar el sistema para el intercambio de tampón del polipéptido de IL-29 concentrado en un tampón de formulación apropiado mediante diafiltración; y (m) filtrar el polipéptido de IL-29 monopegilado concentrado a través de una membrana de 0,2 µm. El polietilenglicol puede incluir un mono-metoxiPEG-propionaldehído de 20 kDa o 30 kDa. El polietilenglicol puede unirse en el extremo N o en el extremo C con el polipéptido de IL-29. Opcionalmente, el polipéptido de IL-29 monopegilado puede estar al menos un 99% monopegilado según se midió mediante HPLC e fase inversa. La memoria descriptiva describe polipéptidos de IL-29 monopegilados producidos y purificados mediante los procedimientos que se describen en el presente documento.

POLINUCLEÓTIDOS Y POLIPÉPTIDOS DE IL-29

[0053] El gen IL-29 humano codifica un polipéptido maduro, que no incluye la secuencia señal, de 128 aminoácidos. La secuencia de IL-29 que se expresa usando un sistema de expresión procariota tiene una metionina en el extremo N, y el nucleótido y las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en las SEQ ID NO: 11 y 12 (denominadas en el presente documento como secuencias de IL-29 naturales), respectivamente. La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 muestra una secuencia optimizada de codón que está comprendida dentro del alcance de la presente invención. "IL-29", "IL-29 recombinante", "IL-29 recombinante humano" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una molécula de IL-29 en general e incluyen IL-29 natural (SEQ ID NO:12), IL-29C172S (SEQ ID NO: 2), Inserción de leucina en IL-29 C172S (SEQ ID NO: 4), IL-29 C172S d2-7 (SEQ ID NO: 6), C1 mutantes de IL-29 (SEQ ID NO: 8). C5 mutantes de IL-29 (SEQ ID NO: 10), fragmentos (fragmentos del extremo N, extremo C y de los extremos N y C), sus variantes y fusiones.

[0054] Los polipéptidos Zcyto21 o IL-29 descritos en el presente documento incluyen también una mutación en la quinta cisteína, C5 del polipéptido maduro. Por ejemplo, C5 del extremo N del polipéptido de la SEQ ID NO: 12, es la cisteína en la posición 172. Esta quinta cisteína o C5 de IL-29 puede estar mutada, por ejemplo, en cualquier aminoácido que no forme un enlace disulfuro con otra cisteína (por ejemplo, serina, alanina, treonina, valina, o asparagina). Estos polipéptidos C5 mutantes de IL-29 tienen un modelo de enlace disulfuro de C1(Cys16 de la SEQ ID NO: 10)/C3(Cys113 de la SEQ ID NO: 10) y C2(Cys50 de la SEQ ID NO: 10)/C4(Cys146 de la SEQ ID NO: 10). Las moléculas C5 mutantes de IL-29 de la presente invención incluyen las moléculas de polinucleótidos que se muestran en SEQ ID NO: 9, que incluyen moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos C5 mutantes de

IL-29 que se muestran en la SEQ ID NO: 10 (solicitudes de patentes de los Estados Unidos con N^{os} de serie 60/700.905 y 60/700.951, publicación PCT WO 03/066002 (Kotenko y col.) y publicación PCT WO 02/092762 (Baum y col.)).

[0055] Los diversos usos de, por ejemplo, una molécula de IL-29 incluyen un uso como un fármaco antivírico
 5 (por ejemplo, para el tratamiento de la hepatitis C, hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana) así como un agente terapéutico para diversos trastornos autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple) y diversos cánceres (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, cáncer de colon, algunas neoplasias malignas de linfocitos B), que se dan a conocer más completamente en la Patente de los Estados Unidos de titularidad compartida N^o 6.927.040, Patente de los Estados Unidos N^o 7.038.032, documentos WO 04/037995,
 10 WO 05/023862, Publicación de Patente de los Estados Unidos N^o 2005-0244423, Publicación de Patente de los Estados Unidos N^o 2006-012644, Solicitud de Patente de los Estados Unidos con N^o de Serie 11/458.945, y Solicitud de Patente de los Estados Unidos con N^o de Serie 11/489.894.

[0056] La memoria descriptiva describe mutantes biológicamente activos de C5 mutantes de cisteína de IL-29, que proporcionan actividad antivírica al menos parcial, o que tienen actividad terapéutica para enfermedades
 15 autoinmunes y/o diversos cánceres. Los mutantes biológicamente activos de C5 mutantes de cisteína de IL-29 incluyen delecciones en los extremos N, C y N y C de IL-29, por ejemplo, los polipéptidos de la SEQ ID NO: 10 codificados por los polinucleótidos de la SEQ ID NO: 9.

[0057] Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N de mutantes C5 de IL-29 incluyen, por ejemplo, los restos de aminoácidos 2-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-546
 20 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-182 de la SEQ ID NO: 10; los restos de aminoácidos 7-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 4-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 10-546 de la SEQ ID NO:9; los restos de aminoácidos 5-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 13-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 6-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por lo nucleótidos 16-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 7-182 de la SEQ ID NO: 10 que están
 25 codificados por los nucleótidos 19-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 8-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 22-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 9-182 de SED ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 28-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 10-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 28-546 de la SEQ ID NO: 9, los restos de aminoácidos 11-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 31-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de
 30 aminoácidos 12-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 34-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 13-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 37-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 14-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 40-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 15-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 43-546 de la SEQ ID NO: 9. Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N de los C5 mutantes
 35 de IL-29 pueden incluir también una metionina en el extremo N si se expresan, por ejemplo, en *E. coli*.

[0058] Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo C de mutantes C5 de IL-29 incluyen, por ejemplo, los restos de aminoácidos 1-181 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-543

de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 1-180 de la SEQ ID NO: 10; los restos de aminoácidos 1-540 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 1-179 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-537 de la SEQ ID NO:9; los restos de aminoácidos 1-178 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-534 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 1-177 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados
 5 por lo nucleótidos 1-531 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 1-176 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-528 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 1-175 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-525 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 1-174 de SED ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-522 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 1-173 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-519 de la SEQ ID NO: 9, los restos de aminoácidos 1-172 de la
 10 SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 1-516 de la SEQ ID NO: 9. Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo C de los C5 mutantes de IL-29 pueden incluir también una metionina en el extremo N si se expresan, por ejemplo, en *E. coli*.

[0059] Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N y en el extremo C de mutantes C5 de IL-29 incluyen, por ejemplo, los restos de aminoácidos 2-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los
 15 nucleótidos 4-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 2-181 de la SEQ ID NO: 10; los restos de aminoácidos 4-543 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 2-180 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-540 de la SEQ ID NO:9; los restos de aminoácidos 2-179 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-537 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 2-178 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por lo nucleótidos 4-534 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 2-177 de la SEQ ID NO:
 20 10 que están codificados por los nucleótidos 4-531 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 2-176 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-528 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 2-175 de SED ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-525 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 2-174 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-522 de la SEQ ID NO: 9, los restos de aminoácidos 2-173 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-519 de la SEQ ID NO: 9; los
 25 restos de aminoácidos 2-172 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 4-516 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-182 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 7-546 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-181 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 7-543 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-180 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 7-540 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-179 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados
 30 por los nucleótidos 7-537 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-178 de la SEQ ID NO: 10; los restos de aminoácidos 7-534 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-177 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 7-531 de la SEQ ID NO:9; los restos de aminoácidos 3-176 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 7-528 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-175 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por lo nucleótidos 7-525 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-174 de la SEQ ID NO:
 35 10 que están codificados por los nucleótidos 7-522 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-173 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 7-519 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 3-172 de SED ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 7-516 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 4-

aminoácidos 16-177 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 46-531 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 16-176 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 46-528 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 16-175 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 46-525 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 16-174 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 46-522 de la SEQ ID NO: 9; los restos de aminoácidos 16-173 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 46-519 de la SEQ ID NO: 9; and los restos de aminoácidos 16-172 de la SEQ ID NO: 10 que están codificados por los nucleótidos 46-516 de la SEQ ID NO: 9. Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N y en el extremo C de los C5 mutantes de IL-29 pueden incluir también una metionina en el extremo N si se expresan, por ejemplo, en *E. coli*.

10 **[0060]** Adicionalmente a los C5 mutantes de IL-29, la memoria descriptiva describe polipéptidos de IL-29 que comprenden una mutación en la primera posición de la cisteína, C1, de polipéptido maduro. Por ejemplo, C1 procedente del extremo N del polipéptido de la SEQ ID NO: 12, es la cisteína en la posición 16. Estos polipéptidos C1 mutantes de IL-29 tienen un modelo de enlace disulfuro previsto de C2(Cys50 de la SEQ ID NO: 8)/C4(Cys146 de la SEQ ID NO: 8) y C3(Cys113 de la SEQ ID NO: 8)/C5(Cys172 de la SEQ ID NO: 8). Las moléculas C1 mutantes de IL-29 incluyen las moléculas de polinucleótidos que se muestran en SEQ ID NO: 7, que incluyen moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos C1 mutantes de IL-29 que se muestran en SEQ ID NO: 8.

15 **[0061]** La memoria descriptiva describe mutantes biológicamente activos de C1 mutantes de cistina de IL-29 que proporcionan al menos actividad antivírica parcial, o que tienen actividad terapéutica para enfermedades autoinmunes y/o diversos cánceres. Los mutantes biológicamente activos de C1 mutantes de cistina de IL29 incluyen deleciones en los extremos N, C y N y C de IL-29, por ejemplo, los polipéptidos de la SEQ ID NO: 8 codificados por los nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

20 **[0062]** Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N de C1 mutantes de IL-29 incluyen, por ejemplo, los restos de aminoácidos 2-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 7-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 4-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 10-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 5-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 13-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 6-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 16-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 7-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 19-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 8-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 22-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 9-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 25-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 10-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 28-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 11-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 31-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 12-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 34-182 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 13-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 37-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-546 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-

546 de la SEQ ID NO: 7; and los restos de aminoácidos 16-182 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-546 de la SEQ ID NO: 7. Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N de los C1 mutantes de IL-29 de la presente invención pueden incluir también una metionina en el extremo N si se expresan, por ejemplo, en *E. coli*.

5 **[0063]** Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo C de C1 mutantes de IL-29 incluyen, por ejemplo, los restos de aminoácidos 1-181 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-543 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-180 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-540 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-179 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-537 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-178 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-534 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-177 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-531 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-176 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-528 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-175 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-525 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-174 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-522 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 1-173 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-519 de la SEQ ID NO: 7; and los restos de aminoácidos 1-172 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 1-516 de la SEQ ID NO: 7. Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo C de los C1 mutantes de IL-29 de la presente invención pueden incluir también una metionina en el extremo N si se expresan, por ejemplo, en *E. coli*.

[0064] Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N y en el extremo C de C1 mutantes de IL-29 incluyen, por ejemplo, 2-181 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-543 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-180 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-540 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-179 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-537 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-178 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-534 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-177 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-531 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-176 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-528 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-175 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-525 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-174 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-522 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-173 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-519 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 2-172 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 4-516 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-181 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 7-543 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-180 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 7-540 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-179 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 7-537 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-178 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 7-534 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-177 de la SEQ ID NO: 9 que están codificados por los nucleótidos 7-531 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-176 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 7-528 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 3-175 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 7-525 de la

aminoácidos 13-172 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 37-516 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-181 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-543 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-180 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-540 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-179 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-537 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-178 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-534 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-177 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-531 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-176 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-528 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-175 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-525 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-174 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-522 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-173 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-519 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 14-172 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 40-516 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-181 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-543 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-180 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-540 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-179 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-537 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-178 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-534 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-177 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-531 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-176 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-528 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-175 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-525 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-174 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-522 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-173 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-519 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 15-172 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 43-516 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-181 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-543 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-180 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-540 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-179 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-537 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-178 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-534 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-177 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-531 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-176 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-528 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-175 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-525 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-174 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-522 de la SEQ ID NO: 7; los restos de aminoácidos 16-173 de SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-519 de la SEQ ID NO: 7; que están codificados por los nucleótidos 16-172 de la SEQ ID NO: 8 que están codificados por los nucleótidos 46-516 de la SEQ ID NO: 7. Los mutantes biológicamente activos modificados en el extremo N y en el extremo C de los C1 mutantes de IL-29 de la presente invención pueden incluir también una metionina en el extremo N si se expresan, por ejemplo, en *E. coli*.

[0065] Los polipéptidos de IL-29 descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, las SEQS ID NO:

2, 4, 6, 8, 10 y 12, que están codificadas por las moléculas de polinucleótidos de IL-29 que se muestran en las SEQS ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 y 11, respectivamente, los fragmentos, mutantes (que incluyen mutantes en el extremo N, extremo C y en los extremos N y C biológicamente activos, variantes y fusiones de los mismos.

EXPRESIÓN DE IL-29 RECOMBINANTE

5 **[0066]** La memoria descriptiva describe vectores de expresión y procedimientos para producir y purificar proteína IL-29 recombinante a partir de un hospedador procariota. IL-29 se había designado anteriormente zcyto21 (IL-29 y zcyto21 se usan indistintamente en el presente documento), y se describe completa mente en la Patente de los Estados Unidos de titularidad compartida N° 6.927.040, Patente de los Estados Unidos N° 7.038.032, documentos WO 04/037995, WO 05/023862, Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2005-0244423, 10 Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2006-012644, Solicitud de Patente de los Estados Unidos con N° de Serie 11/458.945, y Solicitud de Patente de los Estados Unidos con N° de Serie 11/489.894.

En particular, los vectores de expresión y procedimientos descritos en el presente documento comprenden un sistema de expresión en *E. coli* para la producción a gran escala de IL-9 que utiliza una secuencia de codificación de IL-29 con cambios específicos en nucleótidos con el fin de optimizar los codones y la estructura secundaria del 15 ARNm para la traducción en *E. coli*. Usar los vectores de expresión y las condiciones de crecimiento que se describen en el presente documento, mejora significativamente el rendimiento de la proteína recombinante recuperada de las bacterias. En otra realización, para facilitar el desarrollo de la fermentación con alimentación discontinua a una elevada densidad celular, se seleccionó otra cepa de *E. coli*, W3110, como hospedadora para la producción a gran escala de IL-29. Esta cepa hospedadora no es patógena a una elevada densidad celular, en 20 medios de fermentación mínimamente definidos.

[0067] La presente invención proporciona también procedimientos (según se define en las reivindicaciones) para recuperar proteína IL-29 recombinante a partir de un hospedador procariota cuando la proteína IL-29 se expresa por el hospedador y se encuentra en el interior de la célula hospedadora como un cuerpo de inclusión insoluble no glucosilado. Cuando se lisa la célula procariota para aislar los cuerpos de inclusión (denominados 25 también cuerpos refráctiles), los cuerpos de inclusión son agregados de IL-29. Por tanto, los cuerpos de inclusión deben disociarse y disolverse para aislar la proteína IL-29, y generalmente esto requiere el uso de un disolvente caótropro desnaturalizante, lo que da como resultado la recuperación de un polipéptido que se debe replegar para que tenga actividad biológica significativa. Una vez que se repliega la proteína IL-29, debe capturarse y purificarse la proteína. De esta manera, la presente invención proporciona procedimientos para aislar proteína IL-29 insoluble a 30 partir de células procariotas, disolviendo el material de proteína IL-29 insoluble en un disolvente caótropro, diluyendo el disolvente caótropro de tal manera que la proteína IL-29 se repliega y aísla, según se define en las reivindicaciones. La presente invención incluye también procedimientos para capturar la proteína IL-29 renaturalizada a partir del tampón de repliegue diluido usando cromatografía de intercambio catiónico, y purificar la proteína IL-29 replegada usando cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), según se define en las 35 reivindicaciones. Se consigue la purificación adicional usando cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento para eliminar las variantes cargadas de la disolución de IL-29 recombinante.

[0068] La secuencia de codificación del ADN de IL-29 según se usa en el presente documento comprende el

gen humano maduro, es decir, sin secuencia señal. Se sintetizó la secuencia de ADN para reflejar el sesgo del codón de *E. coli*, y se añadió una metionina al extremo N de la proteína madura para el inicio de la traducción.

[0069] Para una producción óptima, la *E. coli* debería 1) no ser patógena; 2) expresar correctamente la proteína diana; 3) mantener la estabilidad del vector de expresión; y 4) crecer bien en medios definidos de mínima fermentación. Se puede usar, por ejemplo, la cepa W3110 de *E. coli*, como hospedadora para la producción de proteína recombinante debido a que cumple estos requerimientos. W3110 es un derivado fototrófico de K-12. El doctor Joshua Lederberg y su equipo de investigación en la Universidad de Wisconsin aislaron esta cepa al comienzo de la década de los 50. Al igual que otros derivados de K-12, la cepa W3110 de *E. coli* no sobrevive en agua, tierra o agua residual sin esterilizar (Smith HW, Infect Dis. mayo de 1978; 137(5): 655-66% Bogosian G. y col., Adv Appl Microbiol. 1991; 36: 87-131; Bogosian G. y col., Appl Environ Microbiol. noviembre de 1996; 62(11): 4114-20; Heitkamp M.A. y col. J Ind. Microbiol. julio de 1993; 11(4): 243-52; Bogosian G. y col., J Ind Microbiol. julio de 1993; 11(4): 235-41; Bogosian G. y col., J Ind Microbiol., enero de 1992; 9(1): 27-36). Además, esta cepa es incapaz de adherirse a las células intestinales de mamíferos y no coloniza el tracto intestinal de mamíferos. Basándose en estos hallazgos, se considera W3110 no patógena y es improbable que sobreviva en tejidos de mamíferos y produzca enfermedad. Adicionalmente, se ha usado extensamente W3110 como hospedadora para la producción de proteínas (Kane J.F. y col., Trends Biotechnol., 6: 95-101; y Kane J.F. y col, En: Surface reactive peptides and polymers: discovery and commercialization (CS Sikes y AP Wheeler, eds.) American Chemical Society Books, Washington, DC.) y crece a una densidad muy elevada en procedimientos de fermentación de alimentación discontinua.

[0070] OmpT es una endopeptidasa periplásmica que escinde específicamente entre dos restos de bases consecutivas y es activa en condiciones de desnaturalización tales como urea 8 M y clorhidrato de guanidina 6 M (White C.B. y col., J Biol Chem. 2 de junio de 1995; 270(22): 12990-4; y Dekker N. y col., Biochemistry. 13 de febrero de 2001; 40(6): 1694-701). Se ha asociado OmpT con la degradación de las proteínas recombinantes expresadas como cuerpos de inclusión en *E. coli*. Mientras que E3110 es un hospedador robusto para la fermentación y expresión de la proteína, no es ideal para el procesamiento en la dirección 3' de IL-29. Una vez que se lisan las células, la proteasa OmpT puede escindir la proteína producida de manera recombinante.

[0071] *E. coli* es susceptible a la infección por bacteriófago T impar que puede dar como resultado un crecimiento ralentizado o fermentaciones fallidas (Ogata S. y col., Uirusu. junio de 2000, 50(1): 17-26). Esto puede tener graves consecuencias económicas. El receptor de ferricromo-hierro codificado por el gen *fhuA* de *E. coli* K12 es un receptor de membrana externa multifuncional necesario para la unión y captación del ferricromo y sirve como el sitio de unión para el bacteriófago T impar. Anticuerpos contra el extremo carboxilo del producto del gen *fhuA* puede evitar la infección por el bacteriófago T5 (Moeck G.S. y col., J Bacteriol. Noviembre de 1995; 177(21): 6118-25).

[0072] Con el fin de racionalizar el procedimiento para la producción de IL-29, se han eliminado los genes *ompT* y *fhuA* de la cepa W3110 hospedadora mediante recombinación homóloga (Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 6 de junio de 2000; 97(12): 6640-5; Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in

Escherichia coli. Gene. A de abril de 2000; 246(1-2): 321-30; y Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 de mayo de 2000; 97(11): 5978-83.). Esta cepa hospedadora desarrollada recientemente se conoce como ZGOLD5 (descrita más completamente a continuación).

5 **[0073]** Las cepas de producción a modo de ejemplo están constituidas por algunas cepas hospedadoras de *E. coli* que transportan diferentes vectores de expresión. Por ejemplo *E. coli* W3110 mantiene de manera estable el plásmido seleccionable por kanamicina para la expresión de IL-29. W3110 tiene el genotipo F-IN(*rmD*⁻*rmE*)1 lambda⁻. ZGOLD1 [F- IN(*mD*- *rmE*)1 lambda⁻ Δ*ompT*::tet] es un mutante Δ*ompT* derivado de W3110. ZGOLD5 [F-IN(*rmD*⁻*rmB*)1 lambda⁻ Δ*ompT*::tet Δ*fhuA*::Cm] es un mutante Δ*fhuA* derivado de ZGOLD1 (W3110). F denota carencia del
 10 plásmido F de *E. coli* endógena (New England Biolabs Catálogo 2005-6, página 270). IN(*rmD*⁻*rmE*)1 denota una inversión en el loci cromosómico que contiene los operones *rmD* y *rmE* (Hill CW and Gray JW, Genetics., agosto de 1988; 119(4): 771778). El número 1 indica que este es el primer alelo informado de esta inversión. Esta redistribución cromosómica está previsto que no tenga efecto sobre la producción de IL-29. *rph1* es una delección de 1 pb que da como resultado un cambio de marco en los últimos 15 codones en la ARNasa. PH, la proteína que
 15 elimina nucleótidos de los extremos 3' de los precursores de ARNt. Esta lesión ejerce un efecto polar sobre el gen *pyrE* adyacente, que codifica la orotato fosforibosiltransferasa. Esto conduce a la privación de pirimidina en medio mínimo Esta auxotrofia parcial, sin embargo, se puede compensar fácilmente suplementando los medios. *ilvG* es un gen que codifica una subunidad de acetolactato sintasa II y acetohidroxi-butanoato sintasa II. Estas enzimas están implicadas en las rutas biosintéticas de valina/leucina e isoleucina, respectivamente. El gen *ilvG* de los derivados de
 20 K12, que incluye W3110 y ZGOL5 contiene un cambio polar en la parte media del gen que produce una prematura terminación de la cadena polipeptídica (Parekh BS y Hatfield GW, J Bacteriol., marzo de 1997; 179(6): 2086-2088). Esta proteína truncada es sensible a valina y experimenta inhibición de la retroalimentación cuando está presente valina. Las rutas que conducen a la síntesis de isoleucina y valina se inhiben en presencia de valina si se priva a la célula de isoleucina. La alimentación mixta, que incluye extracto de levadura, compensa la incapacidad de la cepa
 25 de producir isoleucina en presencia de valina. λ indica la ausencia de secuencias del bacteriófago λ en el estado lisogénico o lítico. *ompT* codifica una endopeptidasa periplásmica que escinde entre dos restos de bases consecutivas (White y col., J Biol. Chem., 2 de junio de 1995; 270(22): 12990-4; y Dekker y col., Biochemistry. 13 de febrero de 2001; 40(6): 1694-701). Se eliminó el gen *ompT* de esta cepa para eliminar cualquier potencial degradación por OmpT (RES-10544). *fhuA* codifica una proteína de membrana externa multifuncional implicada en
 30 la unión y en la captación de ferricromo y en la unión del fago T impar (Ogata y col., Uirusu. junio de 2000; 50(1): 17-26; y Moeck y col., J Bacteriol., noviembre de 1995; 177(21): 6118-25). Se eliminó el gen para evitar la infección de la cepa por el fago T impar, especialmente en los tanques de fermentación.

[0074] Los vectores de expresión que son adecuados para la producción de una proteína deseada en células procariontas comprenden normalmente (1) elementos de ADN procarionta que codifican un origen bacteriano para el
 35 mantenimiento del vector de expresión en un hospedador bacteriano, (2) elementos de ADN que controlan el inicio de la transcripción, tales como un promotor; (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de las transcripciones, tales como un terminador de la transcripción, y (4) un gen que codifica un marcador seleccionable,

tal como el de la resistencia a un antibiótico. La célula hospedadora procarionota produce IL-29 tras la introducción de un vector de expresión y la adición de un inductor apropiado. Según esto, la presente memoria descriptiva describe vectores de expresión que comprenden un promotor, la secuencia de polinucleótidos optimizada con IL-29, y una secuencia terminadora. Se muestran en las SEQs ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 las secuencias de polinucleótidos de IL-29 optimizados a modo de ejemplo. El vector de expresión puede comprender además un marcador seleccionable. El marcador seleccionable puede ser de resistencia a la kanamicina.

[0075] Los vectores de expresión pueden comprender también secuencias de polinucleótidos que codifican una etiqueta peptídica para ayudar en la purificación de la proteína deseada. Las etiquetas peptídicas que son útiles para aislar polipéptidos recombinantes incluyen, por ejemplo, etiquetas de poliHistidina (que tienen una afinidad por la resina quelante de níquel), etiquetas *c-myc*, proteína de unión a calmodulina (aislada con cromatografía de afinidad por calmodulina), sustancia P, la etiqueta RYIRS (que se une con anticuerpos dirigidos contra RYURS), la etiqueta Glu-Glu, la etiqueta FLAG (que se une con anticuerpos dirigidos contra FLAG). Véanse, por ejemplo, Luo y col., Arch. Biochem. Biophys. 329: 215 (1996), Morganti y col., Biotechnol. Appl. Biochem. 23: 67 (1996), y Zheng y col., Gene 186: 55 (1997). Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos etiqueta están disponibles, por ejemplo, de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO).

[0076] Una persona normalmente experta en la técnica estará familiarizada con una multitud de técnicas moleculares para la preparación del vector de expresión. Por ejemplo, el polinucleótido de IL-29 se puede preparar sintetizando moléculas de ácido nucleico usando cebado mutuo, oligonucleótidos largos y las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Ansubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición, John Wiley & Sons, en las páginas 8-8 a 8-9 (1995)). Las técnicas establecidas que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos 2 kilobases de longitud (Adang y col., Plant Molec. Biol. 21: 1131 (1993), Bambot y col., PCR Methods and Applications 2: 266 (1993), Dillon y col., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes," in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993), y Holowachuk y col., PCR Methods Appl. 4:299 (1995)).

[0077] Otro procedimiento para construir sistemas de expresión utiliza a recombinación homóloga usando un sistema de levadura. Véase la Patente de los Estados Unidos Nº 6.207.442. Plasmid Construction by Homologous Recombination. El sistema proporciona un plásmido aceptor universal que se puede usar para clonar un ADN que codifica cualquier polipéptido de interés, incluyendo polipéptidos de fusión. El sistema proporciona procedimientos para preparar moléculas de ADN circular bicatenarias que comprenden una región que codifica una proteína de interés. Uno o más fragmentos de ADN donante que codifican la proteína de interés, es decir, IL-29, se combinan con un plásmido aceptor, un primer enlazante de ADN, y un segundo enlazante de ADN en una célula de *Saccharomyces cerevisiae* hospedadora mientras que el fragmento de ADN donante se une al plásmido aceptor mediante recombinación homóloga del ADN donante, el plásmido aceptor y los enlazantes para formar el plásmido circular cerrado.

[0078] Se puede sintetizar también una molécula de ácido nucleico con "máquinas de genes" usando protocolos tales como el procedimiento de la fosforamidita. Si se sintetiza químicamente, se requiere ADN

bicatenario para una aplicación tal como la síntesis de un gen o un fragmento de gen, preparándose a continuación cada cadena complementaria separadamente. La producción de genes cortos (60 a 80 pares de bases) es técnicamente sencilla y se puede llevar a cabo sintetizando las cadenas complementarias y a continuación hibridándolas. Para la producción de genes más largos (> 300 pares de bases), sin embargo, se pueden necesitar 5 estrategias especiales, debido a que la eficacia del acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química de ADN es rara vez del 100%. Para superar este problema, se ensamblan genes sintéticos (bicatenarios) en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen de entre 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones sobre la síntesis de polinucleótidos, véanse, por ejemplo, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press 1994), Itakura y col., *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323 (1984), y Climie y 10 col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87: 633 (1990).

[0079] Ejemplos de técnicas alternativas que se pueden usar para preparar el gen IL-29 y el vector de expresión incluyen, por ejemplo, digestión y ligadura con endonucleasa de restricción, y reacción en cadena de la polimerasa, todas las cuales son bien conocidas en la técnica.

[0080] Está disponible una amplia variedad de genes marcadores seleccionables (véanse, por ejemplo, 15 Kaufman, *Meth. Enzymol.* 185: 487 (1990); Kaufman, *Meth. Enzymol.* 185: 537 (1990)). Es común de los vectores de expresión que comprendan marcadores de selección, tales como el de la resistencia a la tetraciclina, resistencia a la ampicilina, resistencia a la kanamicina, resistencia a la neomicina, o resistencia al cloranfenicol. Un marcador seleccionable permitirá la selección y/o la detección de células que se han transformado con un vector de expresión a partir de células que no se han transformado. Un vector de expresión puede transportar más de uno de dichos 20 genes de resistencia a un antibiótico. Un ejemplo de marcador seleccionable sin resistencia a antibiótico usa el sistema *hok/sok* del plásmido R1. El gen *hok* codifica la proteína Hok tóxica de 52 aminoácidos y el gen *sok* codifica un ARN de sentido contrario, que es complementario con la secuencia líder del ARNm *hok*. Un experto en la técnica conoce este marcador seleccionable y se describe con más detalle por Gerdes, K. y col., *Genetic Engineering*, 19: 49-61, 1997.

25 **[0081]** Se describe en el presente documento una amplia variedad de células hospedadoras recombinantes adecuadas e incluye, pero sin limitarse a, organismos hospedadores procariontes gram-negativos. Las cepas adecuadas de *E. coli* incluyen W3110, las cepas MM294, TG-1, JM-107, BL21, y UT5600 derivadas de K12. Otras cepas adecuadas incluyen: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF, DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, IM105, IM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, 30 CSH18, ER1451, ER1647, *E. coli* K12, *E. coli* K12 RV308, *E. coli* K12 C600, *E. coli* HB101, *E. coli* K12 C600 R.sub.k-M.sub.k-, *E. coli* K12 RR1 (véase, por ejemplo, Brown (ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Otros hospedadores procariontes gram-negativos pueden incluir *Serratia*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*. Los hospedadores procariontes pueden incluir organismos gram-positivos tales como *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, y *B. thuringiensis* var. *israelensis*, así como *Streptomyces*, por ejemplo, *S. lividans*, *S. ambofaciens*, 35 *S. fradiae*, y *S. griseofuscus*. Las cepas adecuadas de *Bacillus subtilis* incluyen BR151, YB886, MI119, MI120, y B170 (véase, por ejemplo, Hardy, "Bacillus Cloning Methods," en *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (ed.) (IRL Press 1985)). Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas normalizadas para la propagación de

vectores en hospedadores procariotas (véanse por ejemplo, Ausubel y col. (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edición (John Wiley & Sons 1995); Wu y col., *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, Inc. 1997)). Para una introducción general a las cadenas deficientes en proteasas en procariotas, véase, Meerman y col., *Biotechnology* 12: 1107-1110, 1994.

5 **[0082]** Se dan a conocer las técnicas para manipular moléculas de ADN clonado e introducir ADN exógeno en una variedad de células hospedadoras en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y en Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987. Las células hospedadoras transformadas o transfectadas se cultivan según procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros
10 componentes necesarios para el crecimiento de las células hospedadoras escogidas. Se conocen en la técnica una variedad de medios adecuados, entre los que se incluyen medios definidos y medios complejos, e incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y minerales esenciales. Los medios pueden contener también dichos componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. Se seleccionará generalmente el medio de crecimiento para células que contengan el ADN añadido
15 exógenamente mediante, por ejemplo, selección o deficiencia del fármaco en un nutriente esencial que está complementado por el marcador seleccionable transportado en el vector de expresión o transfectado simultáneamente en la célula hospedadora. Se proporcionan cultivos líquidos con suficiente aireación por medios convencionales, tales como agitación de pequeños matraces o rociado de fermentadores. Se pueden seleccionar las células transformadas y propagarse para proporcionar células hospedadoras recombinantes que expresan el gen de
20 interés. Se puede expresar IL-29 en *E. coli* usando el sistema de fusión MBP (proteína de unión a maltosa) (New England Biolabs (NEB; Beverly, MA)). En este sistema, el ADNc de IL-29 se une al extremo 3' del gen *malE* para formar una proteína de fusión MBP-IL-29. Se impulsa la expresión de la proteína de fusión mediante el promotor *tac* y está inactivada hasta que se induce el promotor mediante la adición de IPTG 1 mM (isopropil b-tiogalactosilpiranósido). Puede prepararse la construcción como fusiones en marco con MBP según el Sitio de
25 Múltiple Clonación (MCS) del vector pMAL-c2 (NEB), y según las especificaciones del fabricante.

[0083] Se ha construido un vector de expresión de *E. coli* que contiene un gen con codón optimizado que codifica IL-29 humana. Este vector (pSDH175) contiene los siguientes elementos funcionales; un represor *lacI*, promotor *tac*, potenciador de la traducción G10, sitio de clonación *SmaI* terminador de la transcripción, marcador seleccionable de la kanamicina, y un origen de replicación pMB1 y el gen *ROB*. Todos los números de plásmidos
30 (vectores), según se indica a continuación en la Tabla 1 contienen los mismos elementos funcionales que el vector pSDH175, pero para las sustituciones indicadas del potenciador de la traducción. Se indica también la molécula de IL-29 particular expresada por los diversos plásmidos o vectores de la Tabla 1 en la columna de la construcción de IL-29. Se realizaron numerosos cambios en la estructura de la proteína de IL-29 para potenciar la expresión o mejorar el repliegue. Se cambió la cisteína en la posición 172 de la proteína IL-29 natural (SEQ ID NO: 12) por una
35 serina (SEQ ID NO: 2 o C172S) y se marcó el vector de expresión resultante pSDH177. Se sustituyó el potenciador de la traducción G10 de pSDH177 con el vector Zymo2 (SEQ ID NO: 13) y se marcó este vector pCHAN15. Se eliminaron los aminoácidos en la posición 2-7 de la SEQ ID NO: 2 del vector pCHA15 para formar el vector pTAP440

que codifica esta forma alternativa de IL-29 que se muestra en la SEQ ID NO: 6. El polipéptido de la SEQ ID NO: 6 se denomina también en el presente documento como IL-29 C172S d2-7 o C172S d2-7. En el vector pTAP438, se insertó una leucina en la posición 2, detrás de la metionina del extremo N de la SEQ ID NO: 2 y se muestra como la SEQ ID NO: 4. El polipéptido de la SEQ ID NO: 4 se denomina también en el presente documento como Inserción 5 IL-29 C172S Leu o Inserción C172S Leu. Se transformaron estos vectores en numerosas cepas hospedadoras para formar las cepas de expresión relacionadas en la Tabla 1 a continuación. Se ha producido IL-29 humana recombinante en fermentaciones discontinuas usando numerosos hospedadores y vectores de producción de *E. coli*. La IL-29 se produce como cuerpos de inclusión refráctiles insolubles en las diferentes cepas hospedadoras de *E. coli* usadas.

10

Tabla 1

Cepa de producción	Cepa hospedadora	Número de plásmido	Potenciador de la traducción	Construcción de IL-29
EE669	W3110	pSDH175	G10	Natural con codón optimizado (SEQ ID NO: 11)
EE675	W3110	pSDH177	G10	C172S con codón optimizado (SEQ ID NO: 1)
EE698	W3110	pSDH188	Sitio de unión a ribosoma RBS2	C172S con codón optimizado (SEQ ID NO: 1)
EE826	W3110	pTAP440	Zymo2	C172S d2.7. Codón optimizado (SEQ ID NO: 5)
EE708	ZGOLD1	pSDH188	Sitio de unión a ribosoma RBS2	C172S con codón optimizado (SEQ ID NO: 1)
EE733	ZGOLD1	pCHAN15	Zymo2	C172S con codón optimizado (SEQ ID NO: 1)
EE833	ZGOLD1	pTAP440	Zymo2	C172S d2.7. Codón optimizado (SEQ ID NO: 5)
EE831	ZGOLD1	pTAP438	Zymo2	Inserción C172S Leu (SEQ ID NO: ·)
EE867	ZGOLD5	pTAP440	Zymo2	C172S d2.7. Codón

				optimizado (SEQ ID NO: 5)
EE870	ZGOLD5	pCHAN15	Zymo2	C172S con codón optimizado (SEQ ID NO: 1)

[0084] Se han obtenido elevados niveles de expresión de IL-29 usando células de *E. coli* ZGOLD5 (EB867), descritas a continuación, que contienen el vector de expresión pTA440. Se han desarrollado numerosos procedimientos de fermentación con alimentación discontinua para la producción de IL-29 usando esta cepa. Se puede usar un procedimiento de siembra tanto en una etapa como en dos etapas para iniciar las fermentaciones. El medio de siembra tiene una receta definida (ZSM), descrita a continuación en la Tabla 2, que contiene glucosa al 2% y se inocula usando viales procedentes de un banco de células de trabajo (WCB). Se inició la fermentación con un inóculo de cultivo durante la noche (16-18 horas) que crecía en ZSM. El medio de producción (PCOL18) es un medio de sales definidas que contiene glucosa al 1-2%, hidrolizado de soja al 1% y extracto de levadura al 0,5%. La fase discontinua inicial se desarrolla durante 7-8 horas, seguida por alimentación únicamente con glucosa durante las siguientes 12 horas. La velocidad de alimentación se mantiene constante a lo largo de la fermentación. Se indujo la expresión de IL-29 mediante la adición de isopropil tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM en las 24 h de tiempo de fermentación transcurrido (EFT). El tiempo de fermentación total es de aproximadamente 48 horas.

Tabla 2

<i>Receta de medio de siembra ZSM por litro de medio</i>	
Ingrediente	<i>Cantidad</i>
Extracto de levadura	5,0 g
Sulfato de sodio dibásico	2,0 g
Sulfato de amonio dibásico	2,5 g
Cloruro de amonio	0,5 g
Fosfato de potasio dibásico	14,6 g
Fosfato de potasio monobásico	3,6 g
Agua desionizada	CS hasta 1,0 l
Añadir tras autoclavado:	
Glucosa al 60% (p/v)	33 ml
Disolución de elementos traza	3 ml
MgSO ₄ 1 M	3 ml
Kanamicina (concentración madre 25 mg/ml)	1,0 ml

15 FERMENTACIÓN

[0085] En una realización de la presente invención se puede usar la fermentación discontinua, particularmente cuando se requiere producción a gran escala de IL-29 usando el sistema de expresión de la siguiente invención. Por lo general, la fermentación discontinua comprende la preparación en la primera etapa de un matraz de siembra haciendo crecer cepas de *E. coli* que expresan IL-29 en un medio adecuado en cultivo en matraz
 5 con agitación para permitir el crecimiento hasta una densidad óptica (DO) de 5 a 20 a 600 nm. Un medio adecuado contiene nitrógeno de una(s) fuente(s) tales como sulfato de amonio, fosfato de amonio, cloruro de amonio, extracto de levadura, proteínas animales hidrolizadas, proteínas vegetales hidrolizadas o caseínas hidrolizadas. Se suministrará potasio procedente de fosfato de potasio, fosfato de amonio, ácido fosfórico o fosfato de sodio. Otros componentes del medio incluyen cloruro de magnesio o sulfato de magnesio, sulfato férrico o cloruro férrico, y otros
 10 elementos traza. Se puede suplementar el medio de crecimiento con carbohidratos, tales como fructosa, glucosa, galactosa, lactosa, y glicerol, para potenciar el crecimiento.

[0086] Se prepara un matraz de siembra en la primera etapa como sigue: Se hacen crecer cepas de *E. coli* que producen IL-29 (por ejemplo, W3110, ZGold1 y ZGold5) en un medio adecuado en un cultivo en matraz con agitación para permitir el crecimiento hasta una densidad óptica (DO) de entre 5 y 20 a 600 nm. Un medio adecuado
 15 puede ser, por ejemplo: Super Broth II, APS-Super Broth, o ZSM. Se puede suplementar el medio de crecimiento con carbohidratos para potenciar el crecimiento. Las adiciones de carbohidratos preferidos pueden ser, por ejemplo, glicerol o glucosa añadidos de 1 a 20 g/l de medio con una preferencia entre 10-20 g/l. Se inició el crecimiento inoculando un matraz con agitación (matraz con deflectores de 500 ml a 3000 ml) que contenía un medio de crecimiento preferido con *E. coli* que contenía kanamicina (10-50 µg/ml) procedente de un cultivo madre congelado.
 20 El crecimiento en los matraces con agitación se produce a una temperatura entre 28 y 40°C con una preferencia por el crecimiento entre 30 y 37°C. Se incubaron los matraces con agitación ajustada entre 200 y 300 rpm.

A. CULTIVO CON ALIMENTACIÓN DISCONTINUA – ALIMENTACIÓN ÚNICAMENTE CON GLUCOSA (PCOL001 o PCOL0013)

[0087] Se prepararon reactores de fermentación con un medio de crecimiento adecuado (véase, por ejemplo, la Tabla 3 a continuación) y se esterilizaron. Se ajustó el pH del medio a un pH entre 6,2 y 7,2 con una preferencia por un pH de aproximadamente 6,8. Se puede suplementar el medio de crecimiento con carbohidratos para potenciar el crecimiento. Las adiciones de carbohidratos preferidos serían de glicerol o glucosa añadidos de 10 a 30 g/l de medio con una preferencia entre 10-20 g/l. Se ajustaron los reactores a la aireación y los niveles de agitación apropiados y se inocularon a partir de un matraz de cultivo sembrado en la primera etapa o un reactor de siembra de
 30 la segunda etapa que se ha hecho crecer entre 10 y 20 horas y que tiene una DO entre 5 y 20 a 600 nm. El nivel de inoculación está entre 1 y 5% (sobre un volumen/volumen base) con una preferencia entre 1 y 2% v/v. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 20% de saturación aumentando la velocidad de agitación, aumentando la velocidad de aireación, rociando en oxígeno o diversas combinaciones de los mismos.

[0088] Se alimenta al fermentador una disolución de carbohidrato a una velocidad inicial predeterminada tras
 35 6-8 horas de tiempo de fermentación transcurrido (EFT). La alimentación debería ser inicialmente no más larga de 10 horas de EFT. Se continúa la alimentación hasta la finalización de la fermentación. Las disoluciones de alimentación (glicerol o glucosa) se preparan a 40-70% p/v con una preferencia por glucosa al 50% (p/v). Las

velocidades de alimentación pueden variar entre 5 – 15 gramos de glucosa o glicerol por litro por hora, con una preferencia entre 8-10 g/l/h (volumen de partida). En un tiempo entre 20 y 30 horas de EFT con una preferencia de 24 horas, se añade IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. En un tiempo entre 48 y 56 horas de EFT, se cosecha la fermentación.

5

Tabla 3

<i>Receta de medio PCOL13 por litro de medio</i>	
Ingredientes antes del autoclavado	<i>Cantidad</i>
Extracto de levadura	5,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,9 g
KH ₂ PO ₄	1,75 g
K ₂ HPO ₄	12,25 g
Antiespumante AF204	0,1 ml
Agua desionizada	CS a 0,92 l
Aditivos después de la esterilización:	
MgSO ₄ 1 M	10,0 ml
Disolución de elementos traza	34,0 ml
Glucosa al 60% (p/vol)	33 ml
CaCl ₂ 1 M	1 ml
Kanamicina (concentración madre 25 mg/ml)	1 ml

B. CULTIVO CON ALIMENTACIÓN DISCONTINUA – ALIMENTACIÓN ÚNICAMENTE CON GLUCOSA (PCOL0013 + ADITIVOS)

[0089] Se prepararon reactores de fermentación con un medio de crecimiento adecuado (por ejemplo, la Tabla 3 anterior) y se esterilizaron. Se ajustó el pH del medio a un pH entre 6,2 y 7,2 con una preferencia por un pH de aproximadamente 6,8. Se puede suplementar el medio de crecimiento con carbohidratos para potenciar el crecimiento. Las adiciones de carbohidratos preferidos serían de glicerol o glucosa añadidos de 10 a 30 g/l de medio con una preferencia entre 10-20 g/l. Se puede suplementar el medio de crecimiento con proteínas para potenciar el crecimiento. Las adiciones de proteínas preferidas son de peptona de soja y/o de extracto de levadura añadidos de 5 a 30 g/l de medio con una preferencia entre 5-10 g/l. Se ajustaron los reactores para la aireación apropiada y los niveles de agitación y se inocularon a partir de un matraz de cultivo sembrado en la primera etapa o un reactor de siembra de la segunda etapa que se ha hecho crecer entre 10 y 20 horas y que tiene una DO entre 5 y 20 a 600 nm. El nivel de inoculación está entre 1 y 5% (v/v) con una preferencia entre 1 y 2% v/v. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 20% de saturación aumentando la velocidad de agitación, aumentando la velocidad de aireación, rociando en oxígeno o las diversas combinaciones.

20 **[0090]** Se alimenta una disolución de carbohidrato en el fermentador a una velocidad inicial predeterminada

tras 6-8 horas de tiempo de fermentación transcurrido (EFT). La alimentación necesita ser inicialmente no más larga de 10 horas de EFT. Se continúa la alimentación hasta la finalización de la fermentación. Las disoluciones de alimentación (glicerol o glucosa) se preparan a 40-70% p/v con una preferencia por glucosa al 50% (p/v). Las velocidades de alimentación pueden variar entre 5 – 15 gramos de glucosa o glicerol por litro por hora, con una
5 preferencia entre 8-10 g/l/h (volumen de partida). En un tiempo entre 20 y 30 horas de EFT con una preferencia de 24 horas, se añade IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. En un tiempo entre 48 y 56 horas de EFT, se cosecha la fermentación.

C: CULTIVO CON ALIMENTACIÓN DISCONTINUA – ALIMENTACIÓN MIXTA (PCOL18)

[0091] Se prepararon reactores de fermentación con un medio de crecimiento adecuado y se esterilizaron. Se
10 ajustó el pH del medio a un pH entre 6,2 y 7,2 con una preferencia por un pH de aproximadamente 6,8. Se puede suplementar el medio de crecimiento con carbohidratos para potenciar el crecimiento. Las adiciones de carbohidratos preferidos serían de glicerol o glucosa añadidos de 10 a 30 g/l de medio con una preferencia entre 10-20 g/l. Se ajustaron los reactores para la aireación apropiada y los niveles de agitación y se inocularon a partir de un
15 matraz de cultivo sembrado en la primera etapa o un reactor de siembra de la segunda etapa que se ha hecho crecer entre 10 y 20 horas y que tiene una DO entre 5 y 20 a 600 nm. El nivel de inoculación es entre 1 y 5% (v/v) con una preferencia entre 1 y 2% v/v. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 20% de saturación aumentando la velocidad de agitación, aumentando la velocidad de aireación, rociando en oxígeno o las diversas combinaciones.

[0092] Se alimenta una disolución de carbohidrato al fermentador a una velocidad inicial predeterminada tras
20 6-8 horas de tiempo de fermentación transcurrido (EFT). La alimentación necesita ser inicialmente no más larga de 10 horas de EFT. Las disoluciones de alimentación (glicerol o glucosa) se preparan a 40-70% p/v con una preferencia por glucosa al 50% (p/v). Las velocidades de alimentación que se van a usar pueden variar entre 5 – 15 gramos de glucosa o glicerol por litro por hora, con una preferencia entre 8-10 g/l/h. En un tiempo entre 20 y 30 horas de EFT con una preferencia de 24 horas, se disminuye la velocidad de alimentación de la glucosa a 2-6 g/l/h
25 de alimentación. Se inicia una segunda alimentación que contiene extracto de levadura (20-30% p/p) con una preferencia por 25% (p/p) a una velocidad entre 2-6 g/l/h con una preferencia por 2 g/l/h. En un tiempo entre 48 y 56 horas de EFT, se cosecha la fermentación.

RECUPERACIÓN DE IL-29

[0093] Tras la fermentación, se cosecharon las células mediante centrifugación, se volvieron a suspender en
30 agua desionizada y se homogeneizaron en un homogeneizador APV-Gaulin u otro tipo de equipo de rotura celular. Alternativamente, se capturaron las células directamente del fermentador, se añadió agua desionizada, y a continuación se homogeneizaron en un homogeneizador APV-Gaulin. A continuación se centrifugó el homogenado (tanto en modo continuo como discontinuo), y se obtuvo el residuo que contenía los cuerpos de inclusión tras decantar el sobrenadante. A continuación se lavó el residuo con los cuerpos de inclusión en agua, o tampones Tris
35 con o sin niveles variables de los siguientes compuestos: cloruro de sodio, Tritón X-100, lauril sulfato de sodio.

A. HOMOGENEIZACIÓN Y LAVADO DEL RESIDUO (HOMOGENEIZACIÓN DIRECTA)

[0094] Al final del desarrollo de la fermentación se bajó la temperatura hasta entre 4 y 20°C. Se cosechó el

caldo de la fermentación del reactor y se recogió el caldo a través del puerto de muestreo. Alternativamente, se puede bombear el caldo a través de uno de los puertos de muestreo. El caldo de fermentación puede contener entre un 10-30% de sólidos.

[0095] Se usa un homogeneizador para romper las células de *E. coli*, pero se pueden usar también molinos de perlas y sonicadores. Debería enfriarse el homogeneizador (APV - Gaulin 1000, APV 2000, o Niro Soavi) a 4-15°C antes del uso. Se añadió una cantidad igual de agua desionizada enfriada al caldo de fermentación. Se pasó el caldo de fermentación a través del homogeneizador y se recogió la suspensión celular en un contenedor enfriado. Debería ajustarse la presión del homogeneizador entre 8700-11.600 libras por pulgada cuadrada ("psi") (600-800 bares) para una rotura celular máxima. Se pasó la suspensión a través del homogeneizador entre 1-5 pasos con una preferencia de 3 pasos.

B. COSECHA DISCONTINUA Y LAVADO DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN

[0096] Al final del procedimiento de homogeneización, se transfirieron las células a botellas de centrífuga de 1 l, colocando 0,75 – 1,0 l en cada una. Se puede usar una centrífuga Beckman J6MI con un rotor KompSpin KAJ7.100 de 7.500 a 16.000 x G para cosechar el residuo. Se puede usar también la centrífuga Beckman Avanti JHC con el rotor de ángulo fijo Beckman JLA-8.1 (7.500 a 16.000 x G) o con el rotor Aries JS 5.0 Swinging Bucket con botellas de 2,25 l de 7.500 a 16.000 x G.

[0097] Se centrifugaron las botellas a 4°C durante 30 minutos. Se usó una fuerza de centrifugación de 7.500 a 16.000 x G. Se vertió el caldo de cultivo o el sobrenadante. Se añadió a los residuos agua desionizada o tampón que contenía diversos aditivos. Los aditivos pueden ser Triton X 100 (0,1-5%), cloruro de sodio (10-500 mM), cloruro de cinc (1-10 mM), EDTA (1-10 mM), sacarosa (10-500 mM), lauril sulfato de sodio (0,1-2,0%) o urea (1-8 M). Se añadió la disolución de lavado en un volumen igual al del sobrenadante decantado. Se volvieron a suspender los residuos en el líquido mezclando con una espátula seguido por mezcla con un dispositivo de mezcla monitorizado tal como el homogeneizador Omni EZ. Se llevó a cabo la mezcla hasta que el residuo IB estuvo bien suspendido. Se centrifugó la disolución a 7500 – 16.000 x G, 4°C durante 30 minutos. El caldo del residuo celular se vertió y se añadió agua o se añadió tampón a los residuos. Tras volver a suspender el residuo, se repitió la etapa de centrifugación y se vertió el sobrenadante. Se puede repetir este procedimiento tantas veces como sea necesario.

C. COSECHA CONTINUA DE CÉLULAS Y LAVADO DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN

[0098] Al final del procedimiento de homogeneización se transfirieron las células rotas a un tanque mantenido enfriado. La disolución se pasa a través de una centrífuga continua apropiada tal como una centrífuga de discos apilados Carr o Westfalia. Se puede pasar la disolución a unas velocidades de alimentación entre 1-200 l por hora dependiendo de la centrífuga usada. La fuerza centrífuga de la centrífuga debería estar entre 7.500 y 15.000 x G. Para centrífugas que no descargan tales como una Carr Biopilot o el clarificador Sharples, se pasó la disolución a través de la centrífuga y se recogieron los residuos en la cesta se removió raspando de la cesta. Se pueden usar los residuos tal cual o se volvieron a diluir y pasar de nuevo a través de la centrífuga. Se descartó el sobrenadante.

[0099] Para centrífugas con descarga continua, tales como una centrífuga Westfalia C6 de discos apilados, se pasó la disolución a través de la centrífuga y se mantuvieron los sólidos en la cesta. La corriente de sobrenadante se descargó en continuo. En momentos de ajuste determinados, se descargaron los sólidos en la cesta como una

suspensión en un reactor de recogida apropiado. Alternativamente, se puede pasar agua o tampón sobre los sólidos cuando están en la cesta para proporcionar una etapa de lavado de los sólidos. A continuación se pueden descargar los sólidos en un momento predeterminado.

SOLUBILIZACIÓN DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN

- 5 **[0100]** Se solubilizó el residuo de los cuerpos de inclusión lavados en clorhidrato de guanidina (4-6 M) que contenía ditioneitol (DTT) a 10 – 50 mM. Se llevó a cabo la solubilización durante 1 – 2 horas a 15-25°C. A continuación se clarificó el material solubilizado mediante centrifugación o se usó sin clarificación. Se llevó a cabo el análisis HPLC para determinar la cantidad de IL-29 en la fracción soluble. Basándose en esta concentración, se diluirá el soluto de GuHCl / IL-29 en una mezcla de tampón de repliegue hasta una concentración final entre 1,25 y
10 2,0 mg/ml.

A. SOLUBILIZACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN LAVADOS

- [0101]** Se puede solubilizar la preparación de cuerpos de inclusión lavados usando clorhidrato de guanidina (5-8 M) o urea (7-8 M) que contiene un agente reductor tal como beta mercaptoetanol (10-100 nM) o ditioneitol (5-50 mM). Se pueden preparar las disoluciones en Tris, fosfato, HEPES u otros tampones apropiados. Se pueden
15 solubilizar también los cuerpos de inclusión en tampón Tris a un pH de 10-11,5 con o sin urea (1-2 M). Se pueden solubilizar las células procedentes de 1 litro de caldo de fermentación usando 50 – 200 ml de las disoluciones descritas. El procedimiento preferido es solubilizar los residuos de los cuerpos de inclusión lavados procedentes de 1 litro de caldo de fermentación en 150 ml de GuHCl 6 M preparado en Tris 10 mM pH 8,0 que contiene DTT 40 mM. Se volvió a suspender la suspensión mezclando con una espátula seguido por homogeneización con un
20 homogeneizador Omni EZ o mezclando con un dispositivo mecánico. Incubar la mezcla durante 30 – 90 minutos mezclando a 4-30°C hasta finalizar el procedimiento de solubilización. Se puede centrifugar la mezcla a 7500-16.000 x G a 4°C durante 10-30 minutos usando una centrífuga apropiada. Se decantó y se retuvo la muestra de sobrenadante. Se pueden usar también las muestras no clarificadas para el repliegue.

B. SOLUBILIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE CUERPOS DE INCLUSIÓN LAVADOS

- 25 **[0102]** La preparación de cuerpos de inclusión lavados se puede producir como una suspensión de cuerpos de inclusión en agua. Esto es típico tras la centrifugación y el lavado usando una centrífuga continua. Se pueden añadir agentes solubilizantes tales como clorhidrato de guanidina (4-6 M) o urea (4-7 M) en forma de polvo seco a las suspensiones de los cuerpos de inclusión. Se pueden añadir también tampón (Tris, fosfato, HEPES), sales (cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de potasio) y otros compuestos tales como PEG 3500 en forma de
30 polvo la mezcla de la suspensión. Se pueden añadir agentes reductores tales como beta mercaptoetanol (10-100 mM) o ditioneitol (5-50 mM) en forma de polvo o líquida. Se volvió a suspender la suspensión mezclando con un mezclador de alta potencia provisto de agitador, un homogeneizador Omni EZ, o mezclando con un dispositivo mecánico. La suspensión de cuerpos de inclusión solubilizados se puede centrifugar a continuación a 7500 – 16.000 x G a 4°C durante 10 – 30 minutos usando una centrífuga apropiada. Se decantó y se retuvo la muestra de
35 sobrenadante. Alternativamente, se usó la disolución sin clarificación.

REPLIEGUE

- [0103]** Se llevó a cabo el repliegue añadiendo lentamente la disolución de soluto a la mezcla de repliegue de

arginina, cistina, cisteína, DTT y sales. Se puede añadir el soluto de IL-29 de manera discontinua o mediante alimentación discontinua. La reacción de repliegue de la IL-29 humana recombinante se detiene rápidamente ajustando el pH de 5,8 a 6,1 preferiblemente a aproximadamente 5,9. El repliegue acidificado se diluyó 4,25 veces en acetato de sodio 25 mM, pH 5,6 para precipitar las proteínas incorrectamente plegadas y no plegadas y para
5 acondicionar el repliegue para cargar en la columna de captura. Se dejó sedimentar el precipitado durante la noche y a continuación el precipitado se clarificó mediante un tren de filtración profunda compuesto por un filtro grueso (nominal 0,8 µm) y fino (nominal 0,2 µm) en serie.

[0104] Se determinó la concentración de la IL-29 en la fracción solubilizada mediante HPLC en fase inversa. La determinación del volumen del tampón de repliegue se basa en la cantidad de soluto y en la concentración de IL-
10 29 presente en el soluto. El tampón de repliegue puede contener una variedad de sales y polietilenglicol (0,05-0,5%). Se usó arginina (0,25 a 1,25 M) para evitar la agregación. El nivel preferido de arginina es de 1,0 M con una concentración de IL-29 de 2,0 mg/ml. Se usó un sistema de arrastre de óxido para iniciar la unión del disulfuro de la molécula de IL-29.

[0105] El sistema de arrastre de óxido se basa en mezclas de moléculas reducidas y oxidadas tales como
15 cisteína y cistina, DTT y cistina, glutatión reducido y glutatión oxidado, o DTT y glutatión oxidado. La relación de glutatión reducido a oxidado o cistina puede variar entre 1:1 a 6:1 con una concentración que varía entre 0,5 y 8 mM. La concentración óptima de la IL-29 replegada es aproximadamente de cistina 4 mM : cistina 2 mM.

[0106] Se añadió el soluto que contenía IL-29 rápidamente (1-30 minutos), o lentamente (0,5-5 horas) al
20 tampón de repliegue con mezcla. Se puede añadir IL-29 en una adición, en múltiples adiciones o alimentarse en el momento. Se añadió IL-29 a la mezcla de repliegue hasta una concentración final de entre 0,5 mg/ml y 3,0 mg/ml, preferiblemente 1,5 mg/ml y 2,0 mg/ml. El intervalo de temperatura está entre 4-30°C. El pH está entre 7,3 y 8,5. El reactor que contiene la mezcla de repliegue se mantiene abierto a la atmósfera o se puede rociar con aire o nitrógeno durante la renaturalización. Se dejó tener lugar el repliegue durante 1-6 horas después de la finalización de la adición de soluto. A partir de este momento, se detuvo rápidamente la reacción de repliegue ajustando el pH de la
25 disolución a 5,5-6,5, y preferiblemente a pH 5,9.

CAPTURA DE LA IL-29 REPLEGADA

[0107] Se capturó la IL-29 clarificada, diluida en una columna de intercambio catiónico, por ejemplo
30 ToyoPearl SP 550C (Tosoh Bioscience), a pH 5,5. El tampón de equilibrio es acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, y se eluyó IL-29 unida con un gradiente lineal creciente de cloruro de sodio 2 M, en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. Se ajustó el eluato combinado de la columna de captura a 1,0 M (NH₄)₂SO₄ y se pasó a continuación a través de un filtro de 0,45 µm para eliminar el material insoluble.

[0108] Esta etapa usa una columna de intercambio catiónico para capturar IL-29 plegada apropiadamente de
35 una disolución replegada diluida y clarificada. Con el fin de que IL-29 se una a la columna, se llevó a cabo en primer lugar una dilución de la disolución replegada. Actualmente la IL-29 replegada se diluyó 1,5 a 10 veces en agua o tampón de baja fuerza iónica a pH 5-7. Se llevó a cabo, preferiblemente, una dilución 1:4,25, usando acetato de sodio 25 mM, pH 5,6. La conductividad de la disolución después de la dilución no debería ser más de 30 mS/cm. Se forma un precipitado y se dejó separar por sedimentación de la disolución durante 0,5-18 h a 10-25°C. La

sedimentación se produce preferiblemente durante 10-16 h a 16-22°C. A continuación se filtró el sobrenadante sedimentado para eliminar cualquier resto de precipitado en la disolución, Se ha usado un tren de filtración profunda, compuesto por un filtro nominal de 0,8 µm en serie con un filtro nominal de 0,2 µm, para eliminar el precipitado. Se pueden usar filtros profundos individuales u otros tipos de filtros, tales como un filtro de bolsa o un filtro de densidad
5 graduada, o combinaciones de filtros, para clarificar el sobrenadante replegado diluido. Se puede usar centrifugación, tanto en modo continuo como discontinuo, para eliminar el precipitado.

[0109] Se capturó la IL-29 recombinante en la disolución de repliegue en una columna de intercambio catiónico a pH 5,5. Normalmente, la columna contiene resina ToyoPearl SP 550C de Tosoh Bioscience. Se equilibró la columna con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 y a continuación se cargó con repliegue diluido clarificado de 1,0-
10 17,5 g de IL-29 por litro de factor de carga de resina. Preferiblemente, se cargó la columna con 5,15 g de IL-29 por litro de resina. Tras la carga, se lavó la columna con 2-5 VC de tampón de equilibrio para eliminar el material no unido, y a continuación se eluyó IL-29 unida con un gradiente lineal 0-2 M de cloruro de sodio en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. IL-29 eluye de SP550C de tal manera que el eluato combinado tiene cloruro de sodio aproximadamente 0,7-0,8 M.

15 **[0110]** Se pueden usar muchas diferentes resinas de intercambio catiónico para esta etapa, incluyendo diferentes resinas de sulfopropilo tales como SP Sepharose XL de GE Healthcare, intercambiadores de cationes débiles tales como carboximetilo, así como diferentes tipos de soportes sólidos tales como agarosa o celulosa, y diferentes tamaños de partículas de perlas de resinas. Se podría también trabajar con esta columna a diferentes pH en el intervalo de 5,0 a 7,0 con diferentes tampones y sales. Se pueden emplear estrategias de gradientes
20 modificados o elución por etapas para eluir la IL-29 humana de la columna. Se podría usar la cromatografía de lecho expandido para llevar a cabo esta purificación.

[0111] La disolución filtrada y acondicionada se cargó en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), por ejemplo, ToyoPearl Super Butyl 550C (Tosoh Bioscience), equilibrada previamente con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M, pH 5,5. Se lavó la columna HIC con tampón de equilibrio para eliminar el
25 material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. El eluato combinado de HIC se diluyó 6 veces en agua y a continuación se filtró y se aplicó a una columna de intercambio catiónico, SP Sepharose HP (GE Healthcare), equilibrada en acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 5,5. Se lavó la columna de intercambio catiónico de alto rendimiento con tampón de equilibrio y a continuación se eluyó con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 800 mM, pH 5,5. A
30 continuación se concentró el eluato combinado mediante ultrafiltración en un sistema de filtración en flujo tangencial equipado con una membrana de poliéter sulfona con un corte de pesos moleculares de 5 kDa. El producto concentrado, intermedio de IL-29 a granel, se filtró, se distribuyó en alícuotas y se almacenó a $\leq -60^\circ\text{C}$.

A. PURIFICACIÓN INTERMEDIA DE IL-29 RECOMBINANTE HUMANA

[0112] Se diseñó esta etapa para conseguir la purificación adicional de IL-29, usando cromatografía de
35 interacción hidrófoba (HIC) para eliminar las proteínas de las células hospedadoras y las variantes de IL-29 hidrófobas. Normalmente, se usa la resina ToyoPearl Super Butyl 550C (Tosoh Bioscience) para esta etapa. Se equilibró la resina con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M, pH 5,5. El combinado de IL-29 eluido de la

columna de captura se ajustó a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M, mediante dilución en 2 veces con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 M, pH 5,5, y a continuación se pasó a través de un filtro nominal de 0,2 μm o 0,45 μm . A continuación se cargó la IL-29 ajustada y filtrada en la resina equilibrada hasta un factor de carga de entre 1,0 – 20 g de IL-29 por litro de resina, y preferiblemente a \leq 18 g de IL-29 por litro de resina. Se lavó la columna con tampón de equilibrio
 5 para eliminar el material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M, a acetato de sodio 50 mM sin sulfato de amonio, a pH 5,5. IL-29 eluye de la columna desde aproximadamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,75 M a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0 M. Todas las etapas anteriores se llevaron a cabo a 16-24°C.

[0113] Una persona normalmente experta en la técnica puede usar otras resinas de cromatografía de interacción hidrófoba para esta etapa, incluyendo, pero sin limitarse a, diferentes resinas butil sustituidas, tales como
 10 ToyoPearl Butyl 650M (Tosoh Bioscience), o aquellas sustituidas con fenilo, tales como ToyoPearl Phenyl 650M (Tosoh Bioscience) o Phenyl Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). Además, se pueden usar diferentes tipos de soportes sólidos, tales como agarosa o celulosa, y diferentes tamaños de partículas de perlas de resinas. Se puede trabajar también con esta columna a diferentes pH, en el intervalo de 5,0 a 9,0, a diferentes temperaturas, y con diferentes tampones y sales (por ejemplo, sulfato de sodio). Se pueden usar otras concentraciones de sal en la
 15 carga de la HIC (por ejemplo, sulfato de amonio 1,5 M) para unir IL-29 a la resina de HIC, potenciando el efecto hidrófobo, y se pueden emplear otras estrategias de elución en gradiente o por etapas para eluir IL-29 de la columna. Se puede usar la cromatografía de desplazamiento en las resinas HIC para purificar IL-29, aunque dejando las variantes de creciente hidrofobia unidas a la columna.

B. REFINO DE LA PURIFICACIÓN DE IL-29 HUMANA RECOMBINANTE

[0114] Esta etapa emplea la cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento para eliminar las variantes cargadas de la disolución de IL-29. El término “alto rendimiento” se refiere a la capacidad de resolver mejor diferentes componentes cargados entre sí debido en gran parte a un tamaño de perla de resina reducido. En el procedimiento descrito aquí, la resina de intercambio catiónico de alto rendimiento es aproximadamente 9 veces más pequeña que la perla de resina de intercambio catiónico usada para la etapa de captura de resolución inferior
 25 (SP550C). Para esta etapa de purificación, se usó una resina SP Sepharose HP (GE Healthcare). Se equilibro la resina con acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 5,5. El combinado de la columna HIC se diluyó 6 veces en agua o tampón de baja fuerza iónica, a continuación se filtró en un filtro de 0,2 μm en la preparación para la carga de la columna. A continuación se cargó la disolución de IL-29 ajustada y filtrada en la resina equilibrada hasta un factor de carga de entre 1,0-50 g de IL-29 por litro de resina, y preferiblemente de entre 15-30 g de IL-29
 30 por litro de resina. Se lavó la columna con tampón de equilibrio para eliminar el material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 80 mM, pH 5,5. IL-29 eluye de la columna desde cloruro de sodio aproximadamente 0,4 a 0,6 M.

[0115] Se pueden usar cualquiera de las muchas resinas de intercambio catiónico diferentes para esta etapa, incluyendo diferentes resinas de sulfopropilo, o intercambiadores catiónicos débiles tales como carboximetilo, así
 35 como diferentes tipos de soportes sólidos tales como agarosa o celulosa, y diferentes tamaños de partículas de perlas de resinas. Se puede trabajar con esta columna a diferentes pH en el intervalo de entre 5,0 a 7,0, y con diferentes tampones y sales. Se puede usar la adición de modificadores orgánicos (tales como isopropanol al 10% o

etanol al 10%) a los tampones de equilibrio y elución para alterar la resolución y la selectividad de la columna. Se pueden emplear estrategias de elución en gradiente o por etapas para eluir IL-29 de la columna.

C. CONCENTRACIÓN DE IL-29

[0116] Se diseñó esta etapa para concentrar el eluato de la columna SP HP, generando un intermedio de IL-29 a granel. El combinado de SPHP se concentró aproximadamente 2-4 veces usando una placa de filtración en flujo tangencial (TFF) de poliéter sulfona con un corte de pesos moleculares de 5-kDa y un marco de membrana a una presión transmembrana de 15-25 psi (103,4-172,4 kPa). Después que se eliminó el retentato concentrado del sistema TFF, se enjuagó el sistema con tampón (tal como acetato de sodio 50 mM, pH 5,5) y se combinó el enjuague con el retentato concentrado. A continuación se filtró esta disolución a través de una membrana de 0,2 μ m, a continuación se rellenó en contenedores apropiados y se almacenó en la preparación para la posterior reacción de PEGilación. Se pueden usar membranas de diferentes composiciones, tales como las construidas de celulosa regenerada, y/o diferente porosidad tales como una placa con un corte de pesos moleculares de 3 kDa y un marco de membrana o un sistema de fibra hueca con un corte de pesos moleculares de 10 kDa, para llevar a cabo la etapa de ultrafiltración. Alternativamente, se puede saltar esta etapa de concentración, si el combinado de SPHP tiene suficiente concentración de IL-29 para ejecutar la reacción de PEGilación descrita a continuación.

D. PROPIEDADES DEL INTERMEDIO DE UL-29 HUMANA RECOMBINANTE PURIFICADO A GRANEL

[0117] La pureza del intermedio de IL-29 a granel es al menos del 95%, al menos del 96%, al menos del 97%, al menos del 98%, o al menos del 99% mediante el análisis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio). Los agregados son menos del 1,0%, menos del 0,9%, menos del 0,8%, menos del 0,7%, menos del 0,6%, menos del 0,5%, menos del 0,4%, menos del 0,3%, menos del 0,2%, menos del 0,1%, o menos del 0,005% mediante HPLC por exclusión de tamaño. La heterogeneidad de carga mediante HPLC de intercambio catiónico es aproximadamente del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% y la pureza medida mediante HPLC en fase inversa es al menos del 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

[0118] Se midió la potencia de IL-29 (mismos ensayos para PEG-IL-29) usando un ensayo de actividad basado en células. El bioensayo utiliza una línea celular 293 indicadora de riñón embrionario humano (293 HEK) que se ha genomanipulado para expresar en exceso el receptor de IL-29 humana, y contiene una construcción indicadora de luciferasa de luciérnaga (KZ157), que incluye los elementos de unión ISRE y STAT situados directamente en la dirección 5' del gen de la luciferasa. El receptor de IL-29 es un heterodímero constituido por las subunidades del receptor β de IL-10 (IL-10R β) y del receptor alfa de IL-28 (IL-28R α). Se consiguió la expresión en exceso del receptor de IL-29 mediante transfección estable de células 293 HEK con el ADNc de IL-28R α , que junto con el IL-10R β expresado endógenamente forma el receptor de IL-29 heterodimérico. La unión de IL-29 (o PEG-IL-29) con el receptor de IL-29 activa la ruta de señalización JAK/STAT y da como resultado la formación del factor de transcripción intracelular, ISGF3. La posterior unión de ISGF3 con elementos de la secuencia de ADN de ISRE/STAT dio como resultado la expresión del producto génico de la luciferasa de luciérnaga. IL-29 humana recombinante estuvo activa en el bioensayo de potencia basado en células de IL-29.

[0119] En el bioensayo, las células del ensayo se estimularon con IL-29 (o PEG-IL-29) durante 4 horas y a continuación se lisaron. Tras la adición de una luciferina como sustrato de luciferasa a las células lisadas, se midió la

expresión de la luciferasa indirectamente en unidades de luz relativa (RLU) usando un luminómetro. Se generó una curva de calibración usando un patrón de referencia de IL-29 (o PEG-IL-29), que relacionaba la señal de luminiscencia con la concentración del patrón de referencia de IL-29, a partir de la cual se calculó la potencia de las muestras del control y del ensayo. Se informaron los resultados como unidades de potencia relativa por 5 miligramo (RPU/mg) calculados con respecto al patrón de referencia. Se asignaron unidades de potencia relativa de de uno por miligramo de proteína (1 RPU/mg) para un lote de referencia de desarrollo de IL-29 y PEG-IL-29.

PEGILACIÓN DE IL-29

[0120] Se pueden modificar los polipéptidos de fusión, fragmentos, mutantes, y variantes de IL-29 de la presente invención con polietilenglicol ("PEG"), un procedimiento conocido como "PEGilación". La PEGilación de un 10 polipéptido de IL-29 se puede llevar a cabo mediante cualquier reacción de PEGilación conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, documento EP 0 154 316, Delgado y col., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 9: 249 (1992), Duncan and Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27: 290 (1994), y Francis y col., *Int J Hematol* 68: 1 (1998)). Por ejemplo, se puede llevar a cabo la PEGilación mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactivo. En una solución alternativa, se forman 15 conjugados de polipéptidos de IL-29 condensando PEG activado, en el que se ha sustituido un grupo hidroxilo o amino terminal de PEG mediante un enlazante activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.382.657).

[0121] La PEGilación mediante acilación requiere normalmente hacer reaccionar un derivado de éster activo de PEG con un polipéptido de IL-29. Un ejemplo de un éster de PEG activado es PEG esterificado con N- 20 hidroxisuccinimida. Según se usa en el presente documento, el término "acilación" incluye los siguientes tipos de enlaces entre el polipéptido de IL-29 y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano, y similares. Los procedimientos para preparar IL-29 PEGilado mediante acilación comprenderán normalmente las etapas de (a) hacer reaccionar un polipéptido de IL-29 con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado de aldehído de PEG) en condiciones en las que uno o más grupos de PEG se unan a IL-29, y (b) obtener el(los) producto(s) de reacción. 25 Generalmente, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y en los resultados deseados. Por ejemplo la relación más grande de PEG:IL-29, el porcentaje mayor de producto de IL-29 poliPEGilado.

[0122] La PEGilación mediante alquilación implica generalmente hacer reaccionar un aldehído terminal, por ejemplo, propionaldehído, butiraldehído, acetaldehído, y similar, derivado de PEG con un polipéptido de IL-29 en 30 presencia de un agente reductor. Los grupos PEG se unen preferiblemente al polipéptido mediante un grupo $-CH_2-NH_2$.

[0123] Derivatización mediante alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado toma ventaja de la reactividad diferencial de los diferentes tipos de grupos amino primarios disponibles para la derivatización. Normalmente, la reacción se lleva a cabo a un pH que permite tomar ventaja de las diferencias de pKa entre los 35 grupos ϵ -amino de los restos de lisina y los grupos α -amino del resto del extremo N de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído, a una proteína. La conjugación con el polímero se produce predominantemente en el extremo N de la

proteína sin modificación significativa de otros grupos reactivos tales como grupos amino con cadena secundaria de lisina.

[0124] La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de moléculas conjugadas de IL-29 monopegilada puede comprender las etapas de: (a) hacer reaccionar un polipéptido de IL-28 o 5 IL-29 con un PE reactivo en condiciones de alquilación reductora a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α -amino en el extremo amino del polipéptido de IL-29, y (b) obtener el(los) producto(s) de reacción. El agente reductor usado para la alquilación reductora debería ser estable en una disolución acuosa y preferiblemente ser capaz de reducir solo la base de Schiff formada en el procedimiento inicial de la alquilación reductora. Los agentes reductores preferidos incluyen borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, dimetilamina 10 borano trimetilamina borano, y piridina borano.

[0125] Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de IL-29 monopegilados, las condiciones de reacción de alquilación reductora son aquellas que permiten la unión selectiva del resto de polímero soluble en agua con el extremo N del polipéptido de IL-29. Dichas condiciones de reacción proporcionan generalmente diferencias de pKa entre los grupos amino de lisina y los grupos α -amino en el extremo N. El pH 15 afecta también la relación de polímero a proteína que se va a usar. En general, si el pH es más bajo, se deseará un exceso más grande de polímero a proteína debido a que se necesita más polímero con un grupo α en el extremo N menos reactivo para alcanzar las condiciones óptimas. Si el pH es mayor, el polímero:IL-29 no necesita ser tan grande debido a que están disponibles más grupos reactivos. Normalmente, el pH estará comprendido en el intervalo de 3 – 9, o 3 – 6. Otro factor a considerar es el peso molecular del polímero soluble en agua. Generalmente, 20 el mayor peso molecular del polímero, el número más pequeño de moléculas de polímero que se pueden unir a la proteína. Para las reacciones de PEGilación, el peso molecular típico es aproximadamente de 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, o aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 40 kDa. La relación molar de polímero soluble en agua a IL-29 estará generalmente en el intervalo de 1:1 a 100:1. Normalmente, la relación molar de polímero soluble en agua a IL-29 será de 1:1 a 20:1 para la 25 PEGilación, y de 1:1 a 5:1 para la monoPEGilación.

[0126] En la preparación de una reacción de PEGilación, el intermedio de IL-29 recombinante a granes se descongela y se transfiere a un reactor. Se añadieron tampón de dilución, disolución madre reductora de cianoborohidruro de sodio, y disolución madre de polietilenglicol derivatizado ("PEG") (por ejemplo, un metoxiPEG-propionaldehído lineal de 20 kDa, a la reacción para crear una mezcla con 5 g/l de IL-29, 10 g/l de PEG derivatizado 30 y cianoborohidruro de sodio 20 mM a pH 5,5 en tampón de acetato de sodio 50 mM. Se dejó proceder a la reacción con mezcla durante ~18 h a 16-20°C.

[0127] Esta etapa se usa para unir covalentemente moléculas de polietilenglicol (PEG) a IL-29, y preferentemente una única PEG en el extremo amino de la proteína. Se preparó una disolución madre de PEG, compuesta de, por ejemplo metoxiPEG-propionaldehído lineal de 20 kDa (de, por ejemplo, Nippon Oil & Fat), a una 35 concentración de 20-200 mg/ml en acetato de sodio 50 mM, pH 4,5-6,5, y preferiblemente a una concentración de 100 mg/ml, pH 5,5. Se preparó también una disolución madre reductora, comprendida de cianoborohidruro de sodio 5-500 mM (preferiblemente 100-200 mM) en acetato de sodio 50 mM, con un pH en el intervalo de 4,5-6,5

(preferiblemente pH 5,5). La disolución intermedia de IL-29 a granel se transfirió a un reactor de tamaño apropiado. Se añadieron tampón (tal como acetato de sodio 50 mM, pH 5,5), disolución madre reductora, y disolución madre de PEG secuencialmente en este orden de tal manera que la mezcla final contiene una concentración de 2-6 g/l de IL-29, un exceso molar de 1 a 4 veces de PEG sobre IL-29, y una concentración 5-40 mM de cianoborohidruro de sodio, a un pH que varía entre 4,5-6,5. A continuación se mezcló la disolución de reacción durante 2-24 h a 16-24°C. En un caso preferido, la mezcla de reacción final contiene IL-29 a una concentración de 3-5 g/l, con un exceso molar de 2 veces de PEG con respecto a la concentración del polipéptido de IL-29, y con cianoborohidruro de sodio 10-20 mM, a pH 5,5. Se dejó mezclar esta reacción durante 14-18 h a 16-20°C.

[0128] Un experto en la técnica conocerá el uso de otras moléculas de PEG, de longitud de cadena más larga o más corta, para PEGilar la proteína. Por ejemplo, se ha usado también un metoxiPEG-propionaldehído lineal de 30 kDa para PEGilar IL-29 en las condiciones descritas anteriormente. Se pueden usar moléculas de PE de cadena ramificada más bien que lineal, en la reacción. Se puede derivatizar también el PEG activado usando otros aldehídos, tales como butiraldehído, o se puede derivatizar con otros compuestos de amina reactivos. Se podrían usar otras químicas de PE sitioespecíficas para hacer diana en otros sitios específicos en IL-29 para la derivatización, para el ejemplo de aldehídos reactivo, otros agentes reductores que podrían reducir selectivamente una imina a la amina se pueden sustituir por el cianoborohidruro de sodio. Se pueden ensayar otras condiciones de reacción, temperatura variable, pH, composición y concentración de sal, para potenciar los rendimientos de las especies monoPEGiladas en el extremo N.

PURIFICACIÓN DE PEG-IL-29

[0129] Después de lo anterior, se diluyó 2 veces la reacción de la IL-29 pegilante con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, a continuación se filtró en un filtro de 0,2 µm y se cargó en una segunda columna de intercambio catiónico (por ejemplo SP Sepharose HP (GE Healthcare)), equilibrada en acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 5,5. Se lavó la columna de intercambio catiónico de alto rendimiento con tampón de equilibrio y a continuación se eluyó con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,5. A continuación se concentró el eluato combinado que contenía la IL-29 monopegilada mediante ultrafiltración en un sistema de filtración en flujo tangencial equipado con una membrana de poliéter sulfona con un corte de pesos moleculares de 5 kDa. Tras la concentración, se diafiltró el concentrado frente a 7 diavolumenes de tampón de formulación para generar sustancia fármaco de IL-29 monopegilada a granel ("PEG-IL-29"). La sustancia fármaco a granel formulada se filtró a continuación en un filtro de 0,2 µm, se rellenó, y se almacenó a ≤ -60°C para uso futuro.

A. PURIFICACIÓN MEDIANTE INTERCAMBIO CATIÓNICO DE ALTO RENDIMIENTO DE PEG-IL-29

[0130] Esta etapa emplea cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento para separar proteínas IL-29 multi-PEGiladas (que contienen dos o más grupos PEG por proteína) y no PEGiladas procedentes de las especies monoPEGiladas deseadas. Aquí, se usa resina SP Sepharose HP (GE Healthcare). La resina se equilibró con acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 5,5. Se diluyó 2 veces la mezcla de reacción en agua o tampón de baja fuerza iónica (preferiblemente acetato de sodio 50 mM, pH 5,5), a continuación se filtró con un filtro de 0,2 µm en la preparación para cargar en la columna. A continuación se cargó la disolución ajustada y filtrada en la resina equilibrada, que se lavó a continuación con tampón de equilibrio para eliminar el material no unido. Las

proteínas IL-29 PEGiladas se eluyeron con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,5. IL-29 monoPEGilada eluye de la columna a partir de cloruro de sodio aproximadamente 0,3 M a 0,5 M. A continuación se usó una etapa de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 5,5 para eluir la IL-29 no PEGilada de la columna.

5 **[0131]** Un experto en la técnica conocerá como usar cualquiera de las muchas resinas de intercambio catiónico diferentes para esta etapa, incluyendo otras resinas de sulfopropilo, o intercambiadores catiónicos débiles tales como carboximetilo, así como diferentes tipos de soportes sólidos tales como agarosa o celulosa, y los diferentes tamaños de partículas de las perlas de resina. Un técnico experto conocería también como trabajar con esta columna a diferentes pH en el intervalo de 5,0 a 7,0, y con diferentes tampones y sales. Se puede emplear
10 estrategias de elución en gradiente modificado o por etapas para eluir la IL-29 PEGilada de la columna.

B. CONCENTRACIÓN Y DIAFILTRACIÓN DE PEG-IL-29

[0132] Se diseñó esta etapa para concentrar el eluato de la columna de SP HP que contenía PEG-IL-29, e intercambiar la disolución en tampón de formulación, generando sustancia fármaco de PEG-IL-29 a granel. EL combinado de SPHP se concentró aproximadamente 10-15 veces usando una placa de filtración en flujo tangencial
15 (TFF) de poliéter sulfona con un corte de pesos moleculares de 5 kDa y un marco de membrana. Tras la concentración. Tras la concentración, se diafiltró la disolución para 5-10 diavolumenes frente al tampón de formulación. La concentración y el intercambio de tampón se producen a presiones transmembrana en el intervalo de 15-25 psi. A continuación se eliminó el concentrado con el tampón intercambiado del sistema TFF, se enjuagó el sistema con tampón, y se combinó el enjuague con el retentado concentrado. A continuación se filtró esta disolución
20 a través de una membrana de 0,2 µm, se rellenó a continuación en contenedores apropiados y se almacenó la sustancia fármaco a granel.

[0133] Se pueden usar también membranas de diferente composición, tales como las construidas de celulosa regenerada y/o de diferente porosidad, tales como una placa con un corte de pesos moleculares de 3 kDa y un marco de membrana o un sistema de fibras huecas con un corte de pesos moleculares de 10 kDa, para llevar a cabo
25 esta etapa de ultrafiltración/diafiltración.

PURIFICACIÓN ADICIONAL DE IL-29 Y PEG-IL-29

[0134] Puede ser necesario purificar adicionalmente tanto IL-29 como PEG-IL-29 para eliminar las impurezas y contaminantes restantes. Se puede usar una columna de intercambio aniónico para reducir el nivel de endotoxina. Se diluyó IL-29 a un nivel de conductividad de < 10 mS/cm y se ajustó el pH a 8,0. Se aplicó a una columna dQ
30 Sepharose FF que se había equilibrado con Tris 20 mM, pH 8,0. La IL-29 debería pasar a través de la columna y tener una reducción de aproximadamente el 80% en la endotoxina en comparación con la carga. El polipéptido de IL-29 o el polipéptido de PEG-IL-29 tendrán un nivel de endotoxina de menos de 10 unidades de endotoxina por miligramo de polipéptido de IL-29 o polipéptido de PEG-IL-29 en un ensayo de sisado de amebocitos de Limulus basado en USP <85> (Véase, por ejemplo, R. Nachum y R. N. Berzofsky, J. Clinical Microbiology, 21(5): 759-763
35 (mayo de 1985)). Se pueden usar también membranas Mustang Q o Mustang E cargadas (Pall) para reducir los niveles de endotoxinas en disoluciones entre pH 5,0 y 9,0.

[0135] Otras etapas de purificación que se pueden usar para purificar adicionalmente IL-29 incluyen

cromatografía de afinidad de metales, cromatografía de intercambio aniónico, o cromatografía de inducción de carga hidrófoba. Se puede ser capaces de usar la cromatografía de desplazamiento para purificar IL-29 o PEG-IL-29, por lo que la elevada carga de proteína de la columna provoca la elución de la proteína de interés debido a que está siendo desplazada por impurezas más estrechamente unidas. Alternativamente, puede ser posible utilizar un modo
5 en flujo pistón de la cromatografía por lo que las proteínas se unen a la resina mientras IL-29 o PEG-IL-29 pasa a su través durante la etapa de carga (como en el ejemplo de eliminación de la endotoxina en Q Sepharose, anterior).

PROPIEDADES DE PEG-IL-29 PURIFICADO

[0136] La pureza de la sustancia fármaco de PEG-IL-29 a granel es al menos del 95%, al menos del 96%, al menos del 97%, al menos del 98%, al menos del 99%, o mayor del 99% mediante el análisis en gel de poliacrilamida
10 con dodecil sulfato de sodio. Los agregados son menos del 1,0%, menos del 0,9%, menos del 0,8%, menos del 0,7%, menos del 0,6%, menos del 0,5%, menos del 0,4%, menos del 0,3%, menos del 0,2%, menos del 0,1%, o menos del 0,005% mediante HPLC de exclusión por tamaños. La heterogeneidad de carga mediante HPLC de intercambio catiónico es aproximadamente del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% y la pureza de la monoPEG medida mediante HPLC en fase inversa es al menos del 95, al menos del 96%, al menos del 97%, al
15 menos del 98%, al menos del 99%, o mayor del 99%. Se midió la potencia de PEG-IL-29 usando un ensayo de actividad basado en células según se ha descrito anteriormente. PEG-IL-29 fue activa en el bioensayo de de potencia basado en células.

[0137] La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

20 **EJEMPLO 1**

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN, pTAP395

[0138] El esqueleto usado para construir el vector de expresión de *E. coli* para IL-29 C172S d2-7 (SEQ ID NO: 5) fue pTAP395. pTAP395 contenía el promotor *srp*, dos terminadores de la transcripción, *rrmB T1* y *rrmB T2*, gen de resistencia a la kanamicina, origen de replicación, marcador de selección *URA3* y el locus *ARS-CENS6* para
25 replicación del plásmido en levadura. Se generó pTAP395 a partir de pTAP238 pero tiene un potenciador de la traducción diferente de pTAP238. pTAP395 tuvo el potenciador conocido como *chan2* o *zymo2* (SEQ ID NO: 13). Se construyó pTAP395 usando oligos *zc42188* (SEQ ID NO: 14), *zc42187* (SEQ ID NO: 15), *zc42194* (SEQ ID NO: 16), y *zc29741* (SEQ ID NO: 17) implementando una estrategia de PCR con solapamiento. Los extremos del fragmento de la PCR fueron homólogos con pTAP395. La región central entre los sitios *Xba1* y *SmaI* contenía el potenciador de
30 la traducción *zymo2* ((SEQ ID NO: 13)). Las concentraciones de reactivo de la PCR fueron como sigue: 1 μ M de (SEQ ID NO: 14) y *zc29741* (SEQ ID NO: 17); 50 nM de *zc42187* (SEQ ID NO: 15) y *zc42194* (SEQ ID NO: 16); dNTP 0,2 mM; 1 X tampón de reacción; 0,05 U/ μ l de Pwo (Roche). La reacción consistió en 10 ciclos de los siguiente: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos. Se llevaron a cabo cuatro reacciones en todos. Se precipitó el ADN usando dos volúmenes de etanol al 100% y centrifugando en una
35 microcentrífuga. Se descartó el sobrenadante, y se volvió a suspender el residuo en 10 μ l de agua. Se comprobó el fragmento de ADN resultante para el tamaño mediante electroforesis de 2 μ l en un gel de agarosa 1XTBE al 2%. El tamaño del fragmento de la PCR fue aproximadamente de 150 pb, según se esperaba. El ADN restante se mezcló

con 100 ng de pTAP238 digerido con SmaI. A continuación se mezcló la mezcla de ADN con 100 µl de células de levadura SF838-9Dα electrocompetentes (*S cerevisiae*) y se electroporó en las siguientes condiciones: 25 µF, 0,75 kV, e ∞ ohms. Se añadieron seiscientos microlitros de sorbitol 1,2 M a las células que a continuación se diseminaron en placas – Ura D y se incubaron a 30°C durante aproximadamente 72 horas. Los transformantes de Ura+ de levadura de una placa individual se suspendieron en 2-3 ml de H₂O y se centrifugaron de manera breve hasta aglomerar las células. El aglomerado celular se volvió a suspender en 1 ml de tampón de lisis. (Triton X-100 al 2%), NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0 EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis en un tubo Eppendorf que contenía perlas de vidrio lavadas con 300 µl y 500 µl de fenol-cloroformo. Se sometió a vortización la muestra a intervalos de 1 minuto dos o tres veces y se centrifugó a continuación durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a máxima velocidad. Se transfirieron trescientos microlitros de la fase acuosa a un tubo reciente. Se precipitó el ADN con 600 µl de etanol al 100% y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C. El residuo de ADN se volvió a suspender en 100 µl de H₂O. Cuarenta microlitros de células MC1061 electrocompetentes se transformaron con 1 µl de la prep de ADN plásmido. Se pulsaron las células a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohms. Tras la electroporación, se añadieron 600 µl de SOC a las células, que se dejaron recuperar a 37°C durante una hora. A continuación se plaquearon las células como una alícuota en placas LB (caldo LB (Lennox), Bacto™ Agar al 1,8% (Difco)) que contenía 25 µg/ml de kanamicina y se hicieron crecer durante la noche a 37°C. El cribado mediante PCR de colonias usando los cebadores zc42188 (SEQ ID NO: 14) y zc29741 (SEQ ID NO: 17), identificó células que albergaban la construcción correcta que contenía la secuencia de ADN del potenciador de la traducción alterada. Las condiciones de la PCR fueron como sigue: 0,2 µM de cada oligo, dNTP 0,2 mM; 1 X tampón de reacción, y 0,05 U/µl de Taq (Roche). La plantilla de cada reacción fue una colonia individual repicada de la placa de transformación y suspendida en 10 µl de LB. La PCR consistió en 25 ciclos de los siguiente: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto. Los ocho clones fueron positivos según se evaluó mediante análisis en un gel de agarosa al 2%, y tres se sometieron a análisis de la secuencia. Se conoció el clon correcto como pTAP395.

EJEMPLO 2

25 CONSTRUCCIÓN DEL GEN IL-29 CON CODÓN OPTIMIZADO

[0139] Se construyó la secuencia de codificación de IL-29 para la traducción en *E. coli* a partir de diez oligonucleótidos solapantes (número de Oligo: zc44.559 (SEQ ID NO: 18), zc44.566 (SEQ ID NO: 19), zc44.565 (SEQ ID NO: 20), zc44.562 (SEQ ID NO: 21), zc44.563 (SEQ ID NO: 22), zc44.560 (SEQ ID NO: 23), zc44.561 (SEQ ID NO: 24), zc44.564 (SEQ ID NO: 25), zc44.557 (SEQ ID NO: 26) y zc44.558 (SEQ ID NO: 27). La extensión del cebador seguida por la amplificación de la PCR produjo un gen IL-29 optimizado de longitud completa. El producto final de la PCR se insertó en el vector de clonación, pCR-Blunt II TOPO mediante ligadura. La mezcla de ligadura se transformó en *E. coli*TOP10 competente. Se cribaron los clones resistentes a la kanamicina mediante PCR de colonias. Se verificó un clon positivo mediante secuenciación del ADN.

EJEMPLO 3

35 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pCHAN15

[0140] La estrategia usada para generar el mutante C172S de IL-29 (SEQ ID NO: 1) se basó en el Kit de Mutagénesis Sitiodirigida QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA). Se diseñaron los cebadores para introducir la

mutación C172S según las sugerencias del fabricante Se diseñaron los cebadores zc44.340 (SEQ ID NO: 28) y zc44.341 (SEQ ID NO: 29). Se llevó a cabo la PCR para generar el mutante C172S de IL-29 según las instrucciones proporcionadas con el Kit de mutagénesis QuikChange Se realizaron cinco reacciones idénticas con 50 µl. Cada reacción contenía 2,5 µl de pSDH175 (construcción de expresión con la secuencia del gen IL-29 optimizado) como
 5 plantilla. El cóctel de la PCR contenía los reactivos: 30 µl 10 x tampón de PCR, 125 ng (27,42 µl) de zc44.340 (SEQ ID NO: 28), 125 ng (9,18 µl) de zc44.341 (SEQ ID NO: 29), 6 µl de dNTP, 6 µl de polimerasa *Pfu* Turbo (Stratagene), y 206,4 µl de agua. Cada reacción recibió 47,5 µl del cóctel. Las condiciones de la PCR fueron como sigue: 1 ciclo de 95°C durante 30 segundos seguido por 16 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto, 68°C durante 7 minutos, y 1 ciclo a 68°C durante 7 minutos. Tras el último ciclo, se mantuvo la reacción a 4°C. Las cinco
 10 reacciones de la PCR se consolidaron en un tubo. Según las instrucciones del fabricante, se añadieron 5 µl del enzima de restricción DpnI a la reacción de la PCR y se incubó la mezcla a 37°C durante 2 horas. Se precipitó el ADN añadiendo acetato de sodio 3M al 10% y dos volúmenes de etanol al 100%. Se volvió a suspender el residuo de ADN en 20 µl de agua y se transformó en la cepa DH10B de *E. coli*. A continuación se dejaron recuperar las células electroporadas a 37°C durante 1 hora. Se plaquearon las células en un agar LB que contenía 25 µg/ml de
 15 kanamicina y se incubaron a 37°C durante la noche. Se cribaron diez clones para la presencia de una inserción que contenía IL-29 C172S. Se aisló el ADN de los diez clones usando el Kit QIAprep™ Spin Miniprep (Qiagen) y se analizaron para la presencia de la inserción mediante digestión con XbaI (Roche) y PstI (New England Biolabs). Nueve clones contenían la inserción y se secuenciaron para asegurar que se había introducido la mutación C172S de IL-29. Se guardó un clon para el cual se verificó la secuencia y se marcó pSDH188. Posteriormente, la inserción
 20 IL-29 C172S se subclonó en el vector de expresión, pTAP395. La construcción resultante se conoció como pCHAN15.

EJEMPLO 4

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN, pTAP440

[0141] Los oligos usados para la construcción de pTAP440 fueron zc49249 (cebador directo) (SEQ ID NO:
 25 30) y zc45403 (cebador inverso) (SEQ ID NO: 31). Las primeras 38 bases en el extremo 5' de zc49249 son homólogas con la estructura del vector, pTAP395. Las 26 bases restantes contenidas en el codón inicial de metionina (ATG) seguidas por la secuencia de ADN homólogo con el gen IL-29m comienzan en el octavo codón. El extremo 5 del cebador inverso, zc45403 (SEQ ID NO: 31), está constituido por 39 bases homólogas con la estructura del vector. La segunda mitad, 25 bases, del oligo, son homólogas con el gen IL-29 optimizado que contenía los
 30 cambios en el par de bases que codifican la mutación C172S. Para amplificar el gen de IL-29, se usaron las siguientes concentraciones finales de reactivos en un volumen total de reacción de 100 µl: 0,2 M de cada oligo; dNTP 0,2 mM; 1 X tampón de reacción; DMSO al 10%; y 0,05 U/µl de Pwo (Roche). La plantilla usada para la amplificación fue pCHAN15. La reacción consistió en 25 ciclos de los siguiente: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto. Se precipitó el ADN usando dos volúmenes de etanol al 100% y aglomerado en
 35 una microcentrífuga. Se descartó el sobrenadante, y se volvió a suspender el residuo en 10 µl de agua. Se comprobó el fragmento de ADN resultante para el tamaño mediante electroforesis de 2 µl en un gel de agarosa 1XTBE al 1%. El tamaño del fragmento de la PCR fue aproximadamente de 500 pb, según se esperaba. Se

mezclaron ocho microlitros del ADN con 2 μ l de pTAP395 digerido con SmaI.

[0142] Se mezcló la mezcla de ADN con 100 μ l de células SF838-9D α de levadura electrocompetentes (*S. cerevisiae*) y se llevó a cabo la electroporación en las siguientes condiciones: 25 PF, 0,75 kV, and ∞ ohms. Se añadieron seiscientos microlitros de sorbitol 1,2 M a las células. Se diseminaron las células en placas de –Ura D y se
5 incubaron a 30°C durante aproximadamente 72 horas. Se volvieron a suspender las transformantes Ura+ de una placa individual en 2-3 ml de H₂O y se centrifugaron brevemente para aglomerar las células. El aglomerado celular se volvió a suspender en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis en un tubo Eppendorf que contenía perlas de vidrio lavadas con 300 μ l de ácido y 500 μ l de fenol-cloroformo. Se sometió a vortización la muestra a intervalos de 1
10 minuto dos a tres veces y se centrifugó durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a máxima velocidad. Se transfirieron trescientos microlitros de la fase acuosa a un tubo reciente. Se precipitó el ADN con 600 μ l de etanol al 100% y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C. Se volvió a suspender el residuo de ADN en 50 μ l de H₂O.

[0143] Se llevó a cabo la transformación de las células de *E. coli* electrocompetentes usando 1 μ l de la prep de ADN plásmido y 40 μ l de células MC1061. Se pulsaron las células a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohms. Tras la
15 electroporación, se añadieron 600 μ l de Cado Terrífico a las células, que se dejaron recuperar a 37°C durante una hora. A continuación se plaquearon las células en agar LB que contenía 25 μ g/ml de kanamicina y se hicieron crecer durante la noche a 37°C. El cribado mediante PCR de colonias usando los cebadores zc49249 (SEQ ID NO: 30) y zc45403 (SEQ ID NO: 31), identificó células que albergaban la construcción correcta que contenía la secuencia de ADN de IL-29 C172S d2-7 (SEQ ID NO: 5). Las condiciones de la PCR fueron como sigue: 0,2 μ M de cada oligo,
20 dNTP 0,2 mM; 1 X tampón de reacción, DMSO al 10%; y 0,05 U/ μ l de Pwo (Roche).

[0144] La plantilla para cada reacción fue una colonia individual repicada de la placa de transformación y suspendida en 10 μ l de LB. La PCR consistió en 25 ciclos de lo siguiente: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. Los ocho clones ensayados fueron positivos mediante análisis en un gel de agarosa al 1%, y cuatro se sometieron al análisis de la secuencia. Uno de los clones, conocido ahora como
25 pTAP440, se seleccionó entre los cuatro sometidos a la secuenciación. Se digirieron diez microlitros de ADN en una reacción que contenía 2 μ l de Not1, 3 μ l de tampón NEB, y 15 μ l de agua durante una hora a 37°C. A continuación se mezclaron 7 μ l de esta reacción con 2 μ l de 5 X tampón y 1 μ l de ADN T4 ligasa. Se incubó esta reacción a temperatura ambiente durante una hora. Se usó un microlitro de la reacción de ligadura para transformar la cepa W3110 [F IN(rmD-rmE)I lambda] (obtenida, por ejemplo, de la ATCC) mediante electroporación.

[0145] Se pulsaron las células a 2,0 kV, 25 PF y 400 ohms. Tras la electroporación, se añadieron a las células 600 μ l de SOC (Bacto™ Triptona al 2% (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM). Las células crecieron a 37°C durante una hora y se plaquearon en una alícuota en un agar LB que contenía 25 μ g/ml de kanamicina. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 48 horas. Se repicaron cuatro colonias y se hicieron crecer durante la noche en LB
35 que contenía 25 μ g/ml de kanamicina a 37°C. Se aisló el ADN plásmido usando un Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Se digirió el ADN con PvuII para confirmar la pérdida de los elementos URA3 y CEN/ARS de levadura: 12,5 μ l de ADN, 1 μ l de PvuII, 1,5 μ l de tampón 2 NEB a 37°C durante una hora. Se usó uno de los clones correctos

para transformar 40 µl de ZGOLD5 electrocompetentes [F- IN(rmD-rmE)1 lambda⁻ ΔompT::et ΔfhuA::Cm]. Se pulsaron las células a 2,0 kV, 25 PF y 400ohms. Tras la electroporación, se añadieron 600 µl de SOC a las células. Se hicieron crecer las células a 37°C durante una hora y a continuación se plaquearon en agar LB que contenía 25 µg/ml de kanamicina. Se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas. Debido a que las bacterias se transformaron con plásmido puro, se supuso que las bacterias resistentes a la kanamicina albergaban el plásmido. Se preservó ZGOLD5 transformada con pTAP440 y se almacenó congelada.

EJEMPLO 5

FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA-ECD686 (IL-29: C172S)

[0146] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli W3110 que contenía el vector de expresión pSDH177 (EE675) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica la forma C172S de la molécula de IL-29. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0147] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio PCOL-01 y se esterilizó. Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 10,9 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 5% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0148] Se alimentó una disolución de carbohidratos en el fermentador comenzando a las 9 horas de EFT. Se continuó la alimentación hasta la finalización de la fermentación. La disolución de alimentación fue glucosa preparada al 50% p/p. La velocidad de alimentación fue de 10,8 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 48 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 58,8 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 4,6 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

EJEMPLO 6

FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA –ECD712 (IL-29 C172S)

[0149] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli ZGOLD1 [FIN(rmD-rmE)1 lambda⁻ ΔompT::tet] que contenía el vector de expresión pCHAN15 (EE733) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica la forma C172S de la molécula de IL-29. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0150] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio PCOL-01 y se esterilizó. Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la

temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 13,1 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 5% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0151] Se alimentó una disolución de carbohidratos en el fermentador comenzando a las 9,5 horas de EFT.

- 5 Se continuó la alimentación hasta la finalización de la fermentación. La disolución de alimentación fue glucosa preparada al 50% p/p. La velocidad de alimentación fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 48 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 67,4 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 3,6 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

10 **EJEMPLO 7**

FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA –ECD856 (IL-29: C172S + LEUCINA)

[0152] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli ZGOLD1 que contenía el vector de expresión pTAP438 (EE831) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo.

- 15 Este vector codifica la forma C172S de la molécula de IL-29 que contiene una leucina añadida después de la metionina del extremo N. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0153] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio PCOL-13 y se esterilizó. Tras la

- 20 esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 13,8 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 5% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

- 25 **[0154]** Se alimentó una disolución de carbohidratos en el fermentador comenzando a las 8 horas de EFT. Se continuó la alimentación hasta la finalización de la fermentación. La disolución de alimentación fue glucosa preparada al 50% p/p. La velocidad de alimentación fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 50 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 70,0 g de peso de células secas (DCW)/l a la
- 30 cosecha con un título de fermentación de 7,3 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

EJEMPLO 8

FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA –ECD859 (IL-29 C17S d2-7)

[0155] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli ZGOLD1 que contenía

- 35 el vector de expresión pTAP440 (EE833) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica una forma de la molécula de IL-29 que contiene una delección del segundo al séptimo aminoácidos. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de

agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0156] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio PCOL-13 y se esterilizó. Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 12,5 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 5% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0157] Se alimentó una disolución de carbohidratos en el fermentador comenzando a las 8 horas de EFT. Se continuó la alimentación hasta la finalización de la fermentación. La disolución de alimentación fue glucosa preparada al 50% p/p. La velocidad de alimentación fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 50 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 82,8 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 11,3 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

15 **EJEMPLO 9**

FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA + PEPTONA DE SOJA – ECD892 (IL-29 C172S d2-7)

[0158] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli W3110 que contenía el vector de expresión pTAP440 (EE826) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica una forma de la molécula de IL-29 que contiene una delección del segundo al séptimo aminoácidos. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0159] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio PCOL-13, que contenía 10,0 g/l de hidrolizado de soja, y se esterilizó. Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 11,5 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 5% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0160] Se alimentó una disolución de carbohidratos en el fermentador comenzando a las 8 horas de EFT. Se continuó la alimentación hasta la finalización de la fermentación. La disolución de alimentación fue glucosa preparada al 50% p/p. La velocidad de alimentación fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 50 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 73,3 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 12,5 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

EJEMPLO 10**FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA + EXTRACTO DE LEVADURA – ECD880 (IL-29 C172S d2-7)**

[0161] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli ZGOLD1 que contenía el vector de expresión pTAP440 (EE833) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica una forma de la molécula de IL-29 que contiene una delección del segundo al séptimo aminoácidos. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0162] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l con 3,0 l de medio PCOL-13, que contenía 20,0 g/l de extracto de levadura, y se esterilizó. Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 8,9 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 1% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0163] Se alimentó una disolución de carbohidratos en el fermentador comenzando a las 8 horas de EFT. Se continuó la alimentación hasta la finalización de la fermentación. La disolución de alimentación fue glucosa preparada al 50% p/p. La velocidad de alimentación fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 49 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 66,7 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 10,4 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

EJEMPLO 11**FERMENTACIÓN CON ALIMENTACIÓN DISCONTINUA + ALIMENTACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA – ECD920 (IL-29 C172S d2-7)**

[0164] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli ZGOLD1 que contenía el vector de expresión pTAP440 (EE833) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica una forma de la molécula de IL-29 que contiene una delección del segundo al séptimo aminoácidos. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0165] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l y se esterilizó con 3,0 l de medio PCOL-18, (medio PCOL-13 que contenía 10,0 g/l de peptona de soja). Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a

partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 9,6 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 1% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0166] Se alimentó una disolución de glucosa (50%, p/p) en el fermentador comenzando a las 8 horas de EFT. La velocidad de alimentación fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. Se disminuyó la velocidad de alimentación a las 24 horas de EFT hasta 4,75 g de glucosa/l/h (volumen de partida) y se alimentó también una alimentación de disolución de extracto de levadura al 25% p/p en el fermentador a 4,75 g de extracto de levadura/l/h (volumen de partida). A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 48 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 74,8 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 10,1 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

EJEMPLO 12

FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA + ALIMENTACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA – ECD 964 (IL-29: d2-7)

[0167] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli ZGOLD1 que contenía el vector de expresión pTAP440 (EE867) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica una forma de la molécula de IL-29 que contiene una delección del segundo al séptimo aminoácidos. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0168] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l y se esterilizó con 3,0 l de medio PCOL-18, (medio PCOL-13 que contenía 10,0 g/l de peptona de soja). Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas. El nivel de inoculación fue de 1% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0169] Se alimentó una disolución de glucosa (50%, p/p) en el fermentador comenzando a las 8 horas de EFT. La velocidad de alimentación fue de 9,5 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. Se disminuyó la velocidad de alimentación a las 24 horas de EFT hasta 4,75 g de glucosa/l/h (volumen de partida) y se alimentó también una alimentación de disolución de extracto de levadura al 25% p/p en el fermentador a 4,75 g de extracto de levadura/l/h (volumen de partida). A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 48 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 71,1 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 9,8 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

EJEMPLO 13**FERMENTACIÓN DISCONTINUA CON ALIMENTACIÓN DE GLUCOSA + ALIMENTACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA – ECD 1065 (IL-29 C172S d2-7)**

[0170] Se preparó un matraz con agitación (matraz de 500 ml con deflectores con 100 ml de medio) con medio ZSM. Se inició el crecimiento inoculando el matraz con agitación con 0,10 ml de E. coli ZGOLD5 que contenía el vector de expresión pTAP440 (EE867) procedente de un vial de un banco de investigación de células de trabajo. Este vector codifica una forma de la molécula de IL-29 que contiene una delección del segundo al séptimo aminoácidos. El crecimiento en el matraz con agitación fue a una temperatura de 32°C con la configuración de agitación a 250 rpm. Se hizo crecer el cultivo durante la noche (16 horas) hasta que la DO₆₀₀ estuvo entre 8 y 20 unidades.

[0171] Se preparó un reactor de fermentación de 6 l y se esterilizó con 3,0 l de medio PCOL-18A, (medio PCOL 18 que contiene únicamente 10,0 g/l de glucosa). Tras la esterilización, se suplementó el medio con glucosa a 20 g/l, MgSO₄ 1 M (10 ml/l) y kanamicina a 25 µg/ml. Se ajustó el pH del medio a un pH de 6,8. Se configuró la aireación del reactor a 1 vvm y agitación a 350 rpm, se ajustó la temperatura a 37°C. Se inoculó el fermentador a partir de un cultivo en matraz con agitación que se había hecho crecer durante 16 horas y que tenía una DO de 11,8 a 600 nm. El nivel de inoculación fue de 1% volumen/volumen. El nivel de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30% de saturación aumentando la velocidad de agitación.

[0172] Se alimentó una disolución de glucosa (50%, p/p) en el fermentador comenzando a las 8-9 horas de EFT. A las 9 horas de EFT, la velocidad de alimentación fue de 8,0 gramos de glucosa por litro por hora basándose en el volumen inicial de partida. Se disminuyó la velocidad de alimentación a las 24 horas de EFT hasta 4,0 g de glucosa/l/h (volumen de partida) y se alimentó también una alimentación de de disolución de extracto de levadura al 25% p/p en el fermentador a 4,0 g de extracto de levadura/l/h (volumen de partida). A las 24 horas de EFT, se añadió IPTG al cultivo a una concentración de 1 mM. A las 47 horas de EFT, se cosechó la fermentación. La biomasa alcanzó 66,9 g de peso de células secas (DCW)/l a la cosecha con un título de fermentación de 9,3 g de IL-29/l de caldo de fermentador.

EJEMPLO 14**HOMOGENEIZACIÓN DIRECTA Y CENTRIFUGACIÓN DISCONTINUA DEL CALDO DE FERMENTACIÓN**

[0173] Se mezcló caldo de fermentación (0,90 l) de ECD892 (descrito anteriormente) con 0,90 l de agua desionizada. La mezcla de caldo diluido se pasó a través de un homogeneizador APV-Gaulin 2000 a 10.000 psi. Se conectó la salida del homogeneizador a un intercambiador de calor conectado a un baño de agua con recirculación ajustado a 2-8°C. Se recogió la mezcla tras pasar a través del homogeneizador y se pasó por él una segunda vez a 10.000 psi. Se repitió este procedimiento una tercera y última vez. El rendimiento de IL-29 en el homogenado fue de 10,9 g/l de caldo del fermentador para un rendimiento del procedimiento del 87%.

[0174] Se transfirió el homogenado a botellas de centrífuga de 1 l Beckman, añadiendo 0,90 l de homogenado por botella. A continuación se centrifugó la mezcla durante 30 minutos en una centrífuga Beckman Avanti JHC a 15.000 x g y 4°C usando un rotor de ángulo fijo Beckman JLA-8.1.

[0175] Tras la centrifugación, se añadió agua en un volumen igual al del sobrenadante decantado. Se volvió a suspender el aglomerado mezclando con una espátula seguido por mezcla con un homogeneizador Omni EZ manipulado manualmente. Se homogeneizó la mezcla usando la sonda metálica adecuadamente dimensionada a mitad de potencia durante – 15 segundos o hasta que el aglomerado celular estuvo bien suspendido. A continuación, se volvió a centrifugar la mezcla a 15.00 x G usando una centrífuga Beckman Avanti JHC con el rotor de ángulo fijo Beckman JLA-8.1 durante 30 minutos a 4°C. Se repitió este procedimiento una vez más y el aglomerado de cuerpos de inclusión lavados resultante estuvo listo para el repliegue. Se equalizó el rendimiento de WIB a 9,6 g de IL-29 por litro de caldo del fermentador. El rendimiento de la etapa del homogenado fue del 88% y el rendimiento total del caldo del fermentador fue del 76,8%.

10 **EJEMPLO 15**

HOMOGENEIZACIÓN DIRECTA Y CENTRIFUGACIÓN CONTINUA DEL CALDO DE FERMENTACIÓN

[0176] Se mezcló caldo de fermentación (80,0 Kg) de ECD967 (IL-29 = 80 g/l) con 80,0 Kg de agua desionizada. Se pasó la mezcla de caldo diluido a través de un homogeneizador Niro – Sovai a 800 bares. Se conectó la salida del homogeneizador con un intercambiador de calor conectado a agua muy fría ajustada a 2-8°C. Se recogió la mezcla tras pasar a través del homogeneizador y se pasó por él una segunda vez a la misma presión. Se repitió este procedimiento una tercera y última vez. El rendimiento de IL-29 en el homogenado fue de 7,24 g/l de caldo del fermentador para un rendimiento del procedimiento del 90%.

[0177] A continuación se centrifugó el homogenado que contenía un 3% de sólidos (p/p) y se lavó en una centrífuga de discos apilados Westfalia C6. Se pasó la disolución en la centrífuga a 1,5 l/minuto con la fuerza G ajustada a 15.000 x g. Se mantuvieron los sólidos en la cesta, mientras que la corriente de sobrenadante se descargó en continuo. En un momento de configuración predeterminado, se detuvo la alimentación del homogenado, y se pasó el agua purificada sobre los sólidos a 1,5 l/minuto. Esta agua de lavado desplazó el sobrenadante en la cesta. A continuación se descargaron los sólidos y el agua en la cesta de la centrífuga. Los sólidos descargados (19,81 Kg) contenían un 17,6% de sólidos mientras que el sobrenadante contenía aproximadamente un 1% de sólidos. Los sólidos descargados se dividieron en 8 contenedores conteniendo cada uno 2,4 Kg de material.

EJEMPLO 16

SOLUBILIZACIÓN DE AGLOMERADOS DE WIB USANDO DISOLUCIONES DE GUANIDINA

[0178] Se produjo un aglomerado de WIB procedente de la fermentación de ECD917 según se ha descrito en el Ejemplo 14. El peso húmedo del aglomerado de WIB procedente de 2 litros de caldo de fermentación fue aproximadamente de 400 g. Se preparó una disolución de clorhidrato de guanidina 6 M que contenía ditiotreitol 40 mM según se describe en la Tabla 4 a continuación. Se añadieron trescientos mililitros de esta disolución al aglomerado de WIB y se distribuyó el aglomerado en la disolución usando un pequeño homogeneizador manipulado manualmente. Se dejó solubilizar la disolución durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la solubilización, se obtuvieron 700 ml de soluto. Este material tuvo un contenido de IL-29 de 19,5 mg/ml y el soluto contenía 13,65 g de IL-29. Esto fue equivalente a 6,82 g de IL-29 por litro de caldo de fermentación y el rendimiento del procedimiento fue del 70%.

Tabla 4

Clorhidrato de guanidina / Disolución de DTT		
Componente	Peso de la fórmula	Cantidad / l
Tris 2 M Madre pH 8,0		50 ml
Clorhidrato de guanidina	95,53 g / mol	573,18 g
DTT	154,25 g / mol	3,09 g
Agua desionizada		CS a 1000 ml

EJEMPLO 17**SOLUBILIZACIÓN DE SÓLIDOS DESCARGADOS USANDO POLVOS DE GUANIDINA**

[0179] Se añadieron polvos de Tris base (11,0 g) y clorhidrato de Tris (23,4 g) a 2,4 Kg de sólidos descargados de ECD967 según se ha descrito en el Ejemplo 15. Se mezclaron los polvos en disolución y se ajustó el pH a 8,0. Se añadieron ditiotreitol (14,8 g) y clorhidrato de guanidina (1,37 Kg) a la mezcla. Se dejó mezclar la disolución durante 1 hora sin ajuste de la temperatura. Tras la solubilización, la mezcla pesó 3,78 Kg y contuvo 55,72 gramos de IL-29.

EJEMPLO 18**10 REPLIEGUE DE AGLOMERADOS DE WIB SOLUBILIZADOS USANDO CISTEÍNA Y CISTINA**

[0180] Un reactor de repliegue de vidrio de 5 l se rellenó con 3,0 l de tampón de clorhidrato de arginina 1,1 M y 0,167 l de 20 X sales (véase la Tabla 5 a continuación). Se añadió una barra de agitación al reactor y se colocó el reactor sobre una placa de agitación. A continuación se colocó esta unidad en un incubador refrigerado a 8°C con mezcla ajustada a baja velocidad. A esta disolución se añadieron 0,77 g de DTT y 0,167 l de disolución de cistina 120 mM (Véase la Tabla 6 a continuación). Se usó esta mezcla para preparar un par rédox de cisteína y cistina a una relación de 6:1. Se ajustó el pH a 8,0 con NaOH. Tras la preparación, se retiraron 0,3 l de tampón del reactor y se sustituyeron con 300 ml de la disolución de soluto procedente de ECD917 según se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 16. Los 300 ml de soluto contenían 5,85 g de IL-29 y la concentración de partida de la IL-29 no plegada fue de 1,95 mg/ml. Se dejó replegar la disolución durante 6 horas y se detuvo ajustando el pH a 5,5 con ácido acético al 20%. La concentración final del replegado fue de 1,12 mg/ml. El rendimiento de repliegue fue del 57% y produjo 3,4 g de IL-29 replegada.

Tabla 5

Disolución de tampón de arginina 1,1 M			
Componente	Peso de la fórmula	Molaridad	Cantidad [g o ml/l]
Tris 2 M madre pH 8,0	N/A	0,05 M	27,5 ml
Clorhidrato de arginina	210,67	1,1 M	231,7
PEG 3400	3350		0,55 g
Agua desionizada			CS a 1000 ml

Tabla 6

<i>Disolución de cistina 120 mM preparada en disolución de NaOH 0,25 M</i>		
Componente	Peso de la fórmula	Cantidad [g o ml/l]
L-cistina	240,3 g	28,8 g
Disolución de NaOH 10 M para preparar NaOH 0,25 M	N/A	25,0 ml
Agua		CS a 1000 ml

EJEMPLO 19**REPLIEGUE DE SÓLIDOS DESCARGADOS USANDO CISTEÍNA Y CISTINA**

[0181] Se preparó tampón de repliegue que contenía clorhidrato de arginina 1,1 M según se ha descrito en la Tabla 5. Se prepararon también disoluciones salinas (20X) y disolución de cistina 120 mM según se describe a continuación en la Tabla 7. Se dispensó tampón de arginina (30,0 l) en un tanque de 50 l con camisa con agitación (100 rpm) y se ajustó el enfriamiento a 8°C. A la disolución de tampón de arginina, se añadieron 1,67 l de 20 X sales y 1,67 l de disolución de cistina 120 mM. Se añadió ditiotreitól (7,7 g) y se ajustó el pH a pH 8,0 con NaOH 10 N. Se añadió el soluto (3,35 l) preparado en el Ejemplo 17 a la mezcla durante un periodo de 4 horas. La concentración del repliegue de partida de la IL-29 no plegada fue de 1,72 mg/ml. Se dejó proceder al repliegue durante 2 horas más antes de detener la reacción añadiendo ácido acético al 20% hasta que el pH disminuyó a 5,5. Se diluyó la disolución añadiendo 120 l de tampón de acetato 25 mM pH 5,5. Se dejó sedimentar la disolución durante la noche a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla usando un filtro Cuno BioPlus. La concentración de IL-29 tras el repliegue fue de 0,90 mg/ml. La concentración de IL-29 en la disolución diluida y clarificada fue de 0,19 mg/ml. La IL-29 replegada total en el caldo clarificado fue de 29,85 g para un rendimiento del repliegue del 54%.

Tabla 7

<i>Disolución de 20 X sales</i>	
Componente	Molaridad de la disolución
Disolución madre 20Xsal	NaCl 0,20 M
	MgCl ₂ -6H ₂ O 0,04 M
	KCl 0,01 M
	CaCl ₂ -2H ₂ O

EJEMPLO 20**CLARIFICACIÓN Y CAPTURA DE IL-29 RENATURALIZADA**

[0182] Reduciendo el pH a 6,0 se detiene rápidamente la reacción de repliegue de IL-29. Se diluyó el repliegue acidificado 4,25 veces en acetato de sodio 25 mM, pH 5,6, para precipitar las proteínas incorrectamente plegadas y no replegadas y acondicionar el repliegue para cargar en la columna de captura. Se dejó sedimentar el precipitado durante la noche y a continuación se clarificó el sobrenadante a través de un tren de filtración profunda de un filtro grueso Cuno Zeta Plus Maximizer 30M03 (nominal de 0,8 µm) y un filtro fino Cuno Zeta Plus Maximizer 90M05 (nominal de 0,2 µm) en serie.

[0183] IL-29 clarificada, diluida, se capturó en una columna de intercambio catiónico ToyoPearl SP550C (Tosoh Bioscience) a pH 5,5. En este caso, se usó una columna de 14,5 cm de alto x 14 cm de diámetro (2,23 l de volumen de columna) a 180 cm/h para capturar la IL-29 C172S d2-7 renaturalizada originada de 10 l de caldo de fermentación. Se equilibró la columna con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, y a continuación se cargó con 29 g de IL-29 (13 g/l de resina). Tras lavar con tampón de equilibrio, se eluyó la IL-29 unida con un gradiente lineal creciente de cloruro de sodio 2 M, en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, sobre 5 volúmenes de columna. Basándose en la absorbancia a 280 nm, se recogió un combinado de material eluido desde 0,2 UA a 1,0 UA en el lado frontal del pico de elución. Se recogió un segundo combinado desde 1,0 UA en el lado frontal a 0,2 UA en el borde posterior del pico de elución. Se descartó el primer combinado, comprendido principalmente por proteínas no de IL-29. Se adelantó el segundo combinado para la purificación intermedia. Se han usado procedimientos similares para capturar otras variantes de IL-29, incluyendo la natural, la C172S, y las formas de inserción de C172S Leu.

[0184] Alternativamente, se puede usar una elución isocrática de sal para desplazar IL-29 de la columna. En este ejemplo se usó una columna de 10 cm de alto x 1,6 cm de diámetro de resina ToyoPearl SP550C a 180 cm/h para capturar la IL-29 C172S renaturalizada originada de 4l de caldo de fermentación. Se equilibró la columna con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, y a continuación se cargó con 136 mg de IL-29 (6,8 g/l de resina). Tras lavar con tampón de equilibrio, se eluyó la IL-29 unida con una etapa 10 VC a NaCl 600 mM, en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. Basándose en la absorbancia a 280 nm, el material eluido a partir de ~20% de la señal máxima en la pendiente ascendente del pico a un -20% de la señal máxima en la pendiente descendente se combinó y se adelantó para una purificación intermedia. Se han usando procedimientos de elución por etapas sustancialmente similares para capturar y eluir la variante IL-29 C172 d2-7.

EJEMPLO 21

CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDRÓFOBA USANDO RESINA SUPER BUTYL 550C

[0185] Se ajustó un combinado de captura que contenía la proteína IL-29 C172S d2-7 en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M llevando a cabo una dilución en 2 veces con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 M, pH 5,5. Se pasó esta disolución a través de un filtro de 0,45 μm para eliminar el material insoluble. La disolución cargada en la HIC filtrada y acondicionada se aplicó a una columna ToyoPearl Super Butyl 550C (Tosoh Bioscience), equilibrada previamente con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M, pH 5,5. Aquí, se operó una columna de 14 cm de alto x 14 cm de diámetro (2,16 l de VC) a 150 cm/h a temperatura ambiente para purificar IL-29 originada de 10 l de caldo de fermentación (12,4 g de IL-29 cargada por litro de resina). Se lavó la columna HIC con tampón de equilibrio para eliminar el material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, sobre 10 volúmenes de columna (VC). Basándose en la absorbancia a 280 nm, se recogieron las terceras fracciones de VC desde 0,1 UA en el borde frontal a 0,1 UA en el borde posterior del pico de elución. Se recogieron las medidas de la absorbancia a 280 nm de cada fracción, y la fracción con máxima A280 identificada. Para la combinación, se combinaron las fracciones que contenían al menos un 20% de la DO280 máxima en la pendiente ascendente con las que contenían al menos un 45% de la DO280 máxima en la pendiente descendente.

EJEMPLO 22**CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDRÓFOBA USANDO RESINA BUTYL 650M**

[0186] Se ajustó un combinado de captura que contenía la proteína IL-29 C172S d2-7 en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M llevando a cabo una dilución en 2 veces con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 M, pH 5,5. Se pasó esta disolución a través de un filtro de 0,45 μm para eliminar el material insoluble. La disolución cargada en la HIC filtrada y acondicionada se aplicó a una columna ToyoPearl Butyl 650M (Tosoh Bioscience), equilibrada previamente con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M, pH 5,5. Aquí, se operó una columna de 11 cm de alto x 10 cm de diámetro (0,86 l de VC) a 150 cm/h a temperatura ambiente para purificar IL-29 originada de 4 l de caldo de fermentación (8,6 g de IL-29 cargada por litro de resina). Se lavó la columna HIC con tampón de equilibrio para eliminar el material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, sobre 10 volúmenes de columna (VC). Se han usado procedimientos sustancialmente similares para purificar variantes de inserción de C172S Leu de IL-29 en resina Butyl 650M.

EJEMPLO 23**CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDRÓFOBA USANDO RESINA PHENYL 650M**

[0187] Se ajustó un combinado de captura que contenía la proteína IL-29 C172S en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M llevando a cabo una dilución en 2 veces con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 M, pH 5,5. Se pasó esta disolución a través de un filtro de 0,45 μm para eliminar el material insoluble. La disolución cargada en la HIC filtrada y acondicionada se aplicó a una columna ToyoPearl Phenyl 650M (Tosoh Bioscience), equilibrada previamente con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M, pH 5,5. Aquí, se operó una columna de 10 cm de alto x 10 cm de diámetro (0,785 l de VC) a 150 cm/h a temperatura ambiente para purificar IL-29 originada de 5 l de caldo de fermentación (7,0 de IL-29 cargada por litro de resina). Se lavó la columna HIC con tampón de equilibrio para eliminar el material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, sobre 10 volúmenes de columna (VC). Se han usado procedimientos sustancialmente similares para purificar la proteína IL-29 natural en resina Phenyl 650M.

EJEMPLO 24**25 CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDRÓFOBA USANDO OTRAS RESINAS HIC**

[0188] Se ajustó un combinado de captura que contenía la proteína IL-29 natural en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M llevando a cabo una dilución en 2 veces con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 M, pH 5,5. Se pasó esta disolución de carga HIC a través de un filtro de 0,45 μm para eliminar el material insoluble. La disolución filtrada y acondicionada se dividió y se cargó en seis columnas separadas, equilibrada cada una previamente con acetato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 M, pH 5,5. Las resinas ensayadas incluyen: Ether 650M (Tosoh Bioscience), PPG 600M (Tosoh Bioscience), Octyl Sepharose (GE Healthcare), Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (versión de baja sustitución, GE Healthcare), Butyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), y Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (versión de alta sustitución, GE Healthcare). Aquí, se operó cada columna de 8 cm de alto x 1,6 cm de diámetro (16 ml de VC) a 150 cm/h y a temperatura ambiente para purificar la IL-29 a un factor de carga de 5g de IL-29 por litro de resina. Se lavó cada columna HIC con tampón de equilibrio para eliminar el material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, sobre 10 volúmenes de columna (VC).

EJEMPLO 25**PURIFICACIÓN DE IL-29 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIONICO DE ALTO RENDIMIENTO**

[0189] Se diluyó un combinado de eluato e HIC que contenía la IL-29 C172S d2-7 6 veces en agua, a
 5 continuación se filtró y aplicó a una columna SP Sepharose HP (GE Healthcare) equilibrada en acetato de sodio 50
 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 5,5. Aquí, se operó una columna de 16 cm de alto x 10 cm de diámetro (1,26 l de
 VC) a 125 cm/h para purificar la IL-29 tras cargar a un factor de carga de 15,6 g de IL-29 por litro de resina. Se lavó
 la columna de intercambio catiónico de alto rendimiento con tampón de equilibrio y a continuación se eluyó con un
 gradiente lineal de 20 VC de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 800 mM, pH 5,5. Basándose en la
 10 absorbancia a 280 nm. Se recogieron las terceras fracciones de VC desde 0,1 UA en el borde frontal a 0,1 UA en el
 borde posterior del pico de elución. Se recogieron las medidas de la absorbancia a 280 nm de cada fracción, y se
 identificó la fracción con la máxima A280. Para la combinación, se combinaron las fracciones que contenían al
 menos un 80% de la DO280 máxima en la pendiente ascendente con aquellas que contenían al menos un 20% de la
 DO280 máxima en la pendiente descendente. Se han usado procedimientos similares para purificar la C172S y las
 15 formas de inserción de C172S Leucina de IL-29.

[0190] Alternativamente, se puede usar una elución isocrática de sal para desplazar IL-29 de la columna. En
 este ejemplo, se usó una columna de 15,8 cm de alto x 1,6 cm de diámetro (31,6 ml de VC) de SP Sepharose HP
 (GE Healthcare) a 150 cm/h para purificar IL-29 del combinado de HIC diluido y filtrado. Se equilibró la columna con
 acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 5,5, y a continuación se cargó con 304 mg de IL-29 (9,6 g de
 20 IL-29 por l de resina). Tras lavar con tampón de equilibrio, se eluyó la IL-29 unida con una etapa de 10 VC a NaCl
 450 mM, en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5.

EJEMPLO 26**PURIFICACIÓN DE IL-29 USANDO OTRAS RESINAS DE INTERCAMBIO CATIONICO**

[0191] Una combinación de captura que contenía IL-29 natural se diluyó en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5 a
 25 una conductividad de < 40 mS/cm, a continuación se filtró para generar la carga de la columna, La disolución filtrada
 y acondicionada se dividió y cargó en dos columnas separadas, equilibrada cada una previamente con acetato de
 sodio 50 mM que contenía cloruro de sodio, a pH 5,5, Las resinas ensayadas incluyen: CM Sepharose Fast Flow
 (GE Healthcare), y Fractogel SO₃⁻ (EMD Biosciences). Aquí, cada columna de 8 cm de alto x 1,6 cm de diámetro
 (16,1 ml de VC) se operó a 150 cm/h y a temperatura ambiente para purificar IL-29 tras cargar la columna a un factor
 30 de carga de 5 g de IL-29 por litro de resina. Cada columna de intercambio catiónico se lavó con tampón de equilibrio
 para eliminar el material no unido y a continuación se eluyó la IL-29 con un gradiente lineal de concentración de sal
 creciente en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, sobre 20 volúmenes de columna (VC). Para la columna CM
 Sepharose, el gradiente se expandió en cloruro de sodio desde 100 a 800 mM, mientras que para la resina
 Fractogel, el gradiente fue desde cloruro de sodio 200 mM a 2 M.

EJEMPLO 27**PURIFICACIÓN DE IL-29 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INDUCCIÓN DE CARGA HIDRÓFOBA**

[0192] Se concentró un combinado de eluato d HIC que contenía IL-29 C172S y se intercambió el tampón en

Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8. Se aplicó el material a una columna HyperCel (BioSepra) de mercaptoetil piridina (MEP), previamente equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8. Aquí, se operó una columna de 6 cm de alto x 1,1 cm de diámetro (5,7 ml de VC) a 90 cm/h para purificar la IL-29 a un factor de carga de 10 g de IL-29 por litro de resina. Se lavó la resina MEP HyperCel con tampón de equilibrio a pH 8, a continuación se lavó con un tampón de citrato-fosfato a pH 6,5. A continuación se eluyó la IL-29 recombinante a partir de la resina HCIC con 10 VC de un gradiente lineal de tampón citrato-fosfato a pH 4,5.

EJEMPLO 28

PURIFICACIÓN DE IL-29 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR INMOVILIZACIÓN DE METALES

[0193] Se aplicó un combinado de captura que contenía la forma natural de IL-29 a una columna Chelating Sepharose (GE Healthcare) previamente cargada con cobre (procedente de sulfato cúprico) y equilibrada en acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 800 mM, pH 5,5. Se operó la columna de 8 cm de alto x 1,6 cm de diámetro (16,1 ml de VC) a 150 cm/h para purificar la IL-29 a un factor de carga de ~5 g de IL-29 por litro de resina. Se lavó la resina de cobre quelado con tampón de equilibrio, y se eluyó IL-29 con un gradiente lineal de 10 VC de un tampón que contenía acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 800 mM, imidazol 500 mM, pH 5,5. Se obtuvieron resultados similares cuando se usó tanto níquel (procedente de sulfato de níquel) como cinc (procedente de cloruro de cinc) como el catión divalente quelado.

EJEMPLO 29

CONCENTRACIÓN DE INTERMEDIO PURIFICADO DE IL-29 A GRANEL

[0194] Se concentró el combinado de SPHP aproximadamente 2-3 veces usando una placa de filtración en flujo tangencial (TFF) de poliéter sulfona con un corte de pesos moleculares de 5 kDa y un marco de membrana a una presión transmembrana de -20 psi. Para el procedimiento a escala de 10 l descrito aquí, se usó un área superficial de membrana de 0,1 m² y un caudal de entrada de 15 l/h. Después que se había concentrado el retentato a ~15 mg/ml, se retiró del sistema TFF, se enjuagó el sistema con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. Se combinó el enjuague con el retentato concentrado para alcanzar una concentración final de ~12,5 mg/ml. A continuación se filtró esta disolución a través de una membrana de 0,2 µm, a continuación se rellenó en contenedores apropiados y se almacenó a ≤ -60°C en la preparación para la posterior reacción de PEGilación.

EJEMPLO 30

PEGilación de IL-29 Con mPEG PROPIONALDEHÍDO LINEAL DE 20 kDa

[0195] En preparación de una reacción de PEGilación, se descongeló intermedio de IL-29 a granel y se transfirió a un reactor. Se añadieron tampón de dilución, disolución madre reductora de cianoborohidruro de sodio 100 mM, y 100 g/l de disolución madre de PEG derivatizado (metoxiPEG-propionaldehído lineal de 20 kDa), a la reacción para crear una mezcla con 5 g/l de IL-29, 10 g/l de PEG derivatizado (2 PEG por IL-29 en una base molar), y cianoborohidruro de sodio 20 mM a pH 5,5 en tampón de acetato de sodio 50 mM. En el ejemplo actual, se mezclaron 16 g de intermedio de IL-29 a granel a 13,54 g/l (volumen de 1,18 l) con 1,06 l de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, 0,64 l de disolución madre reductora 100 mM, y 0,32 l de 100 g/l de PEG madre para preparar un volumen de 3,2 l con los parámetros de reacción descritos anteriormente. Se dejó proceder a la reacción con mezcla durante 18 h a 20°C con iluminación tenue. Estas condiciones de reacción dieron como resultado una mezcla de 65-

75% de IL-20 monoPEGilada, con 10-20% de cada una de las especies no PEGiladas y multiPEGiladas, cuando se usa la Inserción de C172S Leucina o la forma C172S d2-7 de la IL-29 recombinante como material de partida. Se obtuvieron también resultados similares cuando se hizo reaccionar IL-29 a una concentración de 3 g/l con 6 g/l de PEG derivatizado (2 PEG por IL-29 en una base molar), y cianoborohidruro de sodio 20 mM a pH 5,5 en tampón de acetato de sodio 50 mM.

EJEMPLO 31

PEGILACIÓN DE IL-29 con mPEG-PROPIIONALDEHÍDO LINEAL DE 30 kDa

[0196] En preparación de una reacción de PEGilación, se descongeló IL-29 a granel y se transfirió a un reactor. Se añadieron tampón de dilución, disolución madre reductora de cianoborohidruro de sodio 100 mM, y 150 g/l de disolución madre de PEG derivatizado (metoxiPEG-propionaldehído lineal de 30 kDa), a la reacción para crear una mezcla con 5 g/l de IL-29, 15 g/l de PEG derivatizado (2 PEG por IL-29 en una base molar), y cianoborohidruro de sodio 20 mM a pH 5,5 en tampón de acetato de sodio 50 mM. En este ejemplo, se mezclaron 2,5 mg de intermedio de IL-29 C172S a granel a 12,8 g/l (volumen de 195 µl) con 155 µl de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, 100 µl de disolución madre reductora 100 mM, y 50 µl de 150 g/l de PEG madre para preparar un volumen de 0,5 ml con los parámetros de reacción descritos anteriormente. Se dejó proceder a la reacción con mezcla durante ~18 h a 20°C con iluminación tenue. Estas condiciones de reacción dieron como resultado una mezcla con niveles comparables de IL-29 mono PEGilada frente a 5 g/l de IL-29, una reacción PEG:proteína 2:1 con la versión de 20 kDa de mPEG-propionaldehído.

EJEMPLO 32

PURIFICACIÓN DE PEG-IL-29 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO DE ALTO RENDIMIENTO

[0197] Después que se completó la reacción de PEG, se diluyó la mezcla de reacción 2 veces con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, a continuación se filtró con un filtro de 0,2 µm y se cargó en una columna SP Sepharose HP (GE Healthcare), equilibrada en acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 5,5. En este ejemplo, se operó una columna de 16 cm de alto x 10 cm de diámetro (1,26 l de VC) a 125 cm/h para purificar la PEG-IL-29 originada de una reacción de PEG usando 8 g de IL-29. Se lavó la columna de intercambio catiónico de alto rendimiento con tampón de equilibrio y a continuación se eluyó con un gradiente lineal de 10 VC de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,5. Basándose en la absorbancia a 280 nm, se recogieron las terceras fracciones de VC desde 0,1 UA en el borde frontal hasta 0,1 UA en el borde posterior del pico de elución. Se analizaron las fracciones para el contenido de monoPEG-IL-29 mediante HPLC en fase inversa, y se combinaron aquellas fracciones que contenían al menos un 99% de IL-29 monoPEGilada. Se obtuvieron resultados similares con respecto a si se derivó la PEG-IL-29 de la Inserción de C172S Leucina o de la forma C172S d2-7 de la molécula.

[0198] Se puede eluir también PEG-IL-29 de la columna SP HP usando procedimientos isocráticos. En este ejemplo, se diluyó una mezcla de reacción que usaba IL-29 C172S d2-7 2 veces con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, a continuación se filtró en un filtro de 0,2 µm y se cargó en una columna SP Sepharose HP (GE Healthcare), equilibrada en acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 5,5. Aquí, se operó una columna de 15,5 cm de alto x 1,6 cm de diámetro (31 ml de VC) a 125 cm/h para purificar la PEG-IL-29 tras la carga de la columna a un

factor de carga de 9 g por litro de resina. Se lavó la columna de intercambio catiónico de alto rendimiento con 5 VC de tampón de equilibrio y con una etapa de 3 VC de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 240 mM, pH 5,5. A continuación se eluyó la PEG-IL-29 con una etapa de 4 VC de cloruro de sodio 400 mM, en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5.

5 EJEMPLO 33

ULTRAFILTRACIÓN/DIAFILTRACIÓN DE PEG-IL-29

[0199] Se combinó el concentrado de eluato de SP HP que contenía la IL-29 monoPEGilada mediante ultrafiltración en un sistema de filtración en flujo tangencial equipado con una placa de poliéter sulfona con un corte de pesos moleculares de 5 kDa y un marco de membrana a una presión transmembrana de -20 psi. Para un procedimiento a escala de 7,7 g descrito aquí, se usó un área superficial de membrana de 0,1 m² y un caudal de entrada de 15 l/h. Después que se había concentrado el retentato a -15-20 mg/l, se diafiltró frente a 7 diavolumenes de tampón de formulación. Se retiró el volumen formulado del sistema TFF, y se enjuagó el sistema con tampón de formulación. Se combinó el enjuague con el retentato concentrado para alcanzar una concentración final de ~12-14 mg/ml. A continuación se filtró esta disolución a través de una membrana de 0,2 µm, a continuación se relleno en contenedores apropiados y se almacenó a ≤ -60°C para generar la sustancia fármaco de PEG-IL-29 a granel.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE IL-29

<130> 05-28PC

20 <150> US 60/723.544

<151> 04-10-2005

<160> 31

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

25 <211> 549

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C172S humana recombinante

30 <221> CDS

<222> (1)...(549)

<400> 1

ES 2 357 152 T3

atg ggt ccg gtt ccg acc tct aaa cca acc acc act ggt aaa ggt tgc	48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys	
1 5 10 15	
cac atc ggt cgt ttc aaa tct ctg tct ccg cag gaa ctg gct tct ttc	96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe	
20 25 30	
aaa aaa gct cgt gac gct ctg gaa gaa tct ctg aaa ctg aaa aac tgg	144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp	
35 40 45	
tct tgc tct tct ccg gtt ttc ccg ggt aac tgg gat ctg cgt ctg ctg	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtt cgt gaa cgt ccg gtt gct ctg gaa gct gaa ctg gct ctg acc	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aaa gtt ctg gaa gct gct gca ggt cct gct ctg gaa gat gtt ctg	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gat cag ccg ctg cac act ctg cac cac atc ctg tct cag ctg cag gct	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgc att caa ccg caa ccg acc gct ggt ccg cgt ccg cgt ggt cgt ctg	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cat cgt ctg cag gaa gct ccg aaa aaa gaa tct gct	432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala	
130 135 140	
ggg tgc ctg gaa gct tct gtt acc ttc aac ctg ttc cgt ctg ctg acc	480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr	
145 150 155 160	
cgt gat ctg aaa tac gtt gct gat ggt aac ctg tct ctg cgt acc tct	528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser	
165 170 175	
acc cat ccg gaa tct acc taa	549
Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 2

<211> 182

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C172S humana recombinante

<400> 2

```

<400> 2
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys
 1      5      10
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
 20
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
 35      40      45
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu
 50      55      60
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr
 65      70      75      80
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu
 85      90      95
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala
 100      105      110
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu
 115      120      125
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala
 130      135      140
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr
 145      150      155      160
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser
 165      170      175
Thr His Pro Glu Ser Thr
 180

```

<210> 3

<211> 552

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Inserción de IL-29 C172S Leucina humana recombinante

<221> CDS

<222> (1)...(552)

10 <400> 3

ES 2 357 152 T3

atg	ctg	ggt	ccg	ggt	ccg	acc	tct	aaa	cca	acc	acc	act	ggt	aaa	ggt	48
Met	Leu	Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	
1				5					10					15		
tgc	cac	atc	ggt	cgt	ttc	aaa	tct	ctg	tct	ccg	cag	gaa	ctg	gct	tct	96
Cys	His	Ile	Gly	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	
			20					25					30			
ttc	aaa	aaa	gct	cgt	gac	gct	ctg	gaa	gaa	tct	ctg	aaa	ctg	aaa	aac	144
Phe	Lys	Lys	Ala	Arg	Asp	Ala	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Asn	
		35					40					45				
tgg	tct	tgc	tct	tct	ccg	ggt	ttc	ccg	ggt	aac	tgg	gat	ctg	cgt	ctg	192
Trp	Ser	Cys	Ser	Ser	Pro	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Trp	Asp	Leu	Arg	Leu	
	50					55					60					
ctg	cag	ggt	cgt	gaa	cgt	ccg	ggt	gct	ctg	gaa	gct	gaa	ctg	gct	ctg	240
Leu	Gln	Val	Arg	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	
65					70					75					80	
acc	ctg	aaa	ggt	ctg	gaa	gct	gct	gca	ggt	cct	gct	ctg	gaa	gat	ggt	288
Thr	Leu	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	
				85					90					95		
ctg	gat	cag	ccg	ctg	cac	act	ctg	cac	cac	atc	ctg	tct	cag	ctg	cag	336
Leu	Asp	Gln	Pro	Leu	His	Thr	Leu	His	His	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	
			100				105						110			
gct	tgc	att	caa	ccg	caa	ccg	acc	gct	ggt	ccg	cgt	ccg	cgt	ggt	cgt	384
Ala	Cys	Ile	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Arg	
		115					120					125				
ctg	cac	cac	tgg	ctg	cat	cgt	ctg	cag	gaa	gct	ccg	aaa	aaa	gaa	tct	432
Leu	His	His	Trp	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Lys	Glu	Ser	
	130					135					140					
gct	ggt	tgc	ctg	gaa	gct	tct	ggt	acc	ttc	aac	ctg	ttc	cgt	ctg	ctg	480
Ala	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	
145					150					155					160	
acc	cgt	gat	ctg	aaa	tac	ggt	gct	gat	ggt	aac	ctg	tct	ctg	cgt	acc	528
Thr	Arg	Asp	Leu	Lys	Tyr	Val	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Leu	Arg	Thr	
				165					170					175		
tct	acc	cat	ccg	gaa	tct	acc	taa									552
Ser	Thr	His	Pro	Glu	Ser	Thr	*									
			180													

<210> 4

<211> 183

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Inserción de IL-29 C172S Leucina humana recombinante

<400> 4

```

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

Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser
          130          135          140
Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu
145          150          155          160
Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr
          165          170          175
Ser Thr His Pro Glu Ser Thr
          180

```

<210> 5

<211> 531

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C172S d2-7 humana recombinante

<221> CDS

<222> (1)...(531)

10 <400> 5

ES 2 357 152 T3

atg	aaa	cca	acc	acc	act	ggt	aaa	ggt	tgc	cac	atc	ggt	cgt	ttc	aaa	48
Met	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	Cys	His	Ile	Gly	Arg	Phe	Lys	
1				5					10					15		
tct	ctg	tct	ccg	cag	gaa	ctg	gct	tct	ttc	aaa	aaa	gct	cgt	gac	gct	96
Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	Phe	Lys	Lys	Ala	Arg	Asp	Ala	
			20					25					30			
ctg	gaa	gaa	tct	ctg	aaa	ctg	aaa	aac	tgg	tct	tgc	tct	tct	ccg	gtt	144
Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Asn	Trp	Ser	Cys	Ser	Ser	Pro	Val	
		35					40					45				
ttc	ccg	ggt	aac	tgg	gat	ctg	cgt	ctg	ctg	cag	gtt	cgt	gaa	cgt	ccg	192
Phe	Pro	Gly	Asn	Trp	Asp	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Val	Arg	Glu	Arg	Pro	
	50					55					60					
ggt	gct	ctg	gaa	gct	gaa	ctg	gct	ctg	acc	ctg	aaa	ggt	ctg	gaa	gct	240
Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	
	65				70					75					80	
gct	gca	ggt	cct	gct	ctg	gaa	gat	ggt	ctg	gat	cag	ccg	ctg	cac	act	288
Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Leu	Asp	Gln	Pro	Leu	His	Thr	
				85				90						95		
ctg	cac	cac	atc	ctg	tct	cag	ctg	cag	gct	tgc	att	caa	ccg	caa	ccg	336
Leu	His	His	Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Ala	Cys	Ile	Gln	Pro	Gln	Pro	
			100					105					110			
acc	gct	ggt	ccg	cgt	ccg	cgt	ggt	cgt	ctg	cac	cac	tgg	ctg	cat	cgt	384
Thr	Ala	Gly	Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Arg	Leu	His	His	Trp	Leu	His	Arg	
		115					120					125				
ctg	cag	gaa	gct	ccg	aaa	aaa	gaa	tct	gct	ggt	tgc	ctg	gaa	gct	tct	432
Leu	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Ser	
	130					135					140					
ggt	acc	ttc	aac	ctg	ttc	cgt	ctg	ctg	acc	cgt	gat	ctg	aaa	tac	ggt	480
Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Leu	Lys	Tyr	Val	
	145				150					155					160	
gct	gat	ggt	aac	ctg	tct	ctg	cgt	acc	tct	acc	cat	ccg	gaa	tct	acc	528
Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser	Thr	His	Pro	Glu	Ser	Thr	
				165					170					175		
taa																531
*																

<210> 6

<211> 176

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C172S d2-7 humana recombinante

<400> 6

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

<210> 7

<211> 549

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C1 mutante humana recombinante

<221> CDS

<222> (1)...(549)

10 <221> variación

<222> 33, 47, 48, 57

<223> n = A, T, G o C

<400> 7

atg ggt ccg gtt ccg acc tct aaa cca acc mcn act ggt aaa ggt dnn 48
 Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Xaa Thr Gly Lys Gly Xaa
 1 5 10 15
 cac atc grn cgt ttc aaa tct ctg tct ccg cag gaa ctg gct tct ttc 96
 His Ile Xaa Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe
 20 25 30
 aaa aaa gct cgt gac gct ctg gaa gaa tct ctg aaa ctg aaa aac tgg 144
 Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp
 35 40 45

tct tgc tct tct ccg gtt ttc ccg ggt aac tgg gat ctg cgt ctg ctg	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtt cgt gaa cgt ccg gtt gct ctg gaa gct gaa ctg gct ctg acc	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aaa gtt ctg gaa gct gct gca ggt cct gct ctg gaa gat gtt ctg	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gat cag ccg ctg cac act ctg cac cac atc ctg tct cag ctg cag gct	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgc att caa ccg caa ccg acc gct ggt ccg cgt ccg cgt ggt cgt ctg	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cat cgt ctg cag gaa gct ccg aaa aaa gaa tct gct	432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala	
130 135 140	
ggg tgc ctg gaa gct tct gtt acc ttc aac ctg ttc cgt ctg ctg acc	480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr	
145 150 155 160	
cgt gat ctg aaa tac gtt gct gat ggt ray ctg tgc ctg cgt acc tct	528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Xaa Leu Cys Leu Arg Thr Ser	
165 170 175	
acc cat ccg gaa tct acc taa	549
Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 8

<211> 182

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C1 mutante humana recombinante

<221> VARIANTE

<222> (11)...(11)

10 <223> Xaa = Thr o Pro

<221> VARIANTE

<222> (16)...(16)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

<221> VARIANTE

15 <222> (19)...(19)

<223> Xaa = Gly o Asp

<221> VARIANTE

<222> (170)...(170)

<223> Xaa = Asn o Asp

<400> 8

Met	Gly	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Thr	Xaa	Thr	Gly	Lys	Gly	Xaa
1				5					10					15	
His	Ile	Xaa	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	Phe
			20					25					30		

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

<210> 9

5 <211> 549

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C5 mutante humana recombinante

10 <221> CDS

<222> (1)...(549)

<221> variación

<222> 33, 57, 515, 516

<223> n = A, T, G o C

15 <400> 9

atg ggt ccg gtt ccg acc tct aaa cca acc mcn act ggt aaa ggt tgc	48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Xaa Thr Gly Lys Gly Cys	
1 5 10 15	
cac atc grn cgt ttc aaa tct ctg tct ccg cag gaa ctg gct tct ttc	96
His Ile Xaa Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe	
20 25 30	
aaa aaa gct cgt gac gct ctg gaa gaa tct ctg aaa ctg aaa aac tgg	144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp	
35 40 45	
tct tgc tct tct ccg gtt ttc ccg ggt aac tgg gat ctg cgt ctg ctg	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtt cgt gaa cgt ccg gtt gct ctg gaa gct gaa ctg gct ctg acc	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aaa gtt ctg gaa gct gct gca ggt cct gct ctg gaa gat gtt ctg	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gat cag ccg ctg cac act ctg cac cac atc ctg tct cag ctg cag gct	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgc att caa ccg caa ccg acc gct ggt ccg cgt ccg cgt ggt cgt ctg	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cat cgt ctg cag gaa gct ccg aaa aaa gaa tct gct	432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala	
130 135 140	
ggt tgc ctg gaa gct tct gtt acc ttc aac ctg ttc cgt ctg ctg acc	480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr	
145 150 155 160	
cgt gat ctg aaa tac gtt gct gat ggt ray ctg dnn ctg cgt acc tct	528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Xaa Leu Xaa Leu Arg Thr Ser	
165 170 175	
acc cat ccg gaa tct acc taa	549
Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 10

<211> 182

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> IL-29 C5 mutante humana recombinante

<221> VARIANTE

<222> (11)...(11)

10 <223> Xaa = Thr o Pro

<221> VARIANTE

<222> (19)...(19)

<223> Xaa = Gly o Asp

<221> VARIANTE

5 <222> (170)...(170)

<223> Xaa = Asp o Asn

<221> VARIANTE

<222> (172)...(172)

<223> Xaa = Ser, Ala, Thr, Val o Asn

10 <400> 10

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

Arg	Asp	Leu	Lys	Tyr	Val	Ala	Asp	Gly	Xaa	Leu	Xaa	Leu	Arg	Thr	Ser
			165						170					175	
Thr	His	Pro	Glu	Ser	Thr										
			180												

<210> 11

<211> 549

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(549)

<400> 11

ES 2 357 152 T3

atg ggt ccg gtt ccg acc tct aaa cca acc acc act ggt aaa ggt tgc	48
Met Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys	
1 5 10 15	
cac atc ggt cgt ttc aaa tct ctg tct ccg cag gaa ctg gct tct ttc	96
His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe	
20 25 30	
aaa aaa gct cgt gac gct ctg gaa gaa tct ctg aaa ctg aaa aac tgg	144
Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp	
35 40 45	
tct tgc tct tct ccg gtt ttc ccg ggt aac tgg gat ctg cgt ctg ctg	192
Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu	
50 55 60	
cag gtt cgt gaa cgt ccg gtt gct ctg gaa gct gaa ctg gct ctg acc	240
Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr	
65 70 75 80	
ctg aaa gtt ctg gaa gct gct gca ggt cct gct ctg gaa gat gtt ctg	288
Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu	
85 90 95	
gat cag ccg ctg cac act ctg cac cac atc ctg tct cag ctg cag gct	336
Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala	
100 105 110	
tgc att caa ccg caa ccg acc gct ggt ccg cgt ccg cgt ggt cgt ctg	384
Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu	
115 120 125	
cac cac tgg ctg cat cgt ctg cag gaa gct ccg aaa aaa gaa tct gct	432
His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala	
130 135 140	
ggt tgc ctg gaa gct tct gtt acc ttc aac ctg ttc cgt ctg ctg acc	480
Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr	
145 150 155 160	
cgt gat ctg aaa tac gtt gct gat ggt aac ctg tgc ctg cgt acc tct	528
Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser	
165 170 175	
acc cat ccg gaa tct acc taa	549
Thr His Pro Glu Ser Thr *	
180	

<210> 12

<211> 182

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Potenciador de la traducción Zymo2

<400> 13

aatacatta 9

10 <210> 14

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador de oligonucleótido ZC42188

<400> 14

cggtcgtat aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt ccctctag 49

<210> 15

<211> 53

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC42187

<400> 15
gcgataaca attccccctct agaaataatt ttgtattaca ttaagaagga gat 53

<210> 16

<211> 63

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC42194

<400> 16

10 gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca cccgggatat atatctcctt cttaatgtaa 60
tac 63

<210> 17

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido C29741

<400> 17

tctgatttaa tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cg 42

<210> 18

20 <211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44559

25 <400> 18

atgggtccgg ttccgacctc taaaccaacc accactggta aagggttgcca catcggtcgt 60
tt 62

<210> 19

<211> 78

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44566

<400> 19

tcttccagag cgtcacgagc ttttttgaaa gaagccagtt cctgctggaga cagagatttg 60
aaacgaccga tgtggcaa 78

35 <210> 20

<211> 84

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido ZC44565

<400> 20

```
tcgtgacgct ctggaagaat ctctgaaact gaaaaactgg tcttgctctt ctccggtttt 60
cccgggtaac tgggatctgc gtct                                     84
```

<210> 21

<211> 74

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44562

<400> 21

```
tcagggtcag agccagttca gttccagag caaccggacg ttcacgaacc tgcagcagac 60
gcagatccca gtta                                             74
```

15

<210> 22

<211> 73

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido ZC44563

<400> 22

```
aactggctct gaccctgaaa gttctggaag ctgctgcagg tcttgcctctg gaagatgttc 60
tggatcagcc gct                                             73
```

<210> 23

25 <211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44560

30 <400> 23

```
atgcaagcct gcagctgaga caggatgtgg tgcagagtgt gcagcggctg atccagaaca 60
```

<210> 24

<211> 76

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44561

5 <400> 24

tcagctgcag gcttgcattc aaccgcaacc gaccgctggt ccgctccgc gtggctcgtct 60
gcaccactgg ctgcat 76

<210> 25

<211> 71

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44564

<400> 25

aacagaagct tccaggcaac cagcagattc ttttttcgga gcttcctgca gacgatgcag 60
ccagtgggtgc a 71

15 <210> 26

<211> 69

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido ZC44557

<400> 26

tgcttgggaag cttctgttac cttcaacctg ttccgtctgc tgacctgga tctgaaatac 60
gttctgat 69

<210> 27

<211> 65

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44558

<400> 27

ttaggtagat tccggatggg tagaggtacg caggcacagg ttaccatcag caacgtattt 60
cagat 65

30

<210> 28

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC44340

<400> 28

5 cgttgctgat ggtaacctgt ctctgcgtac ctctacccat c 41

<210> 29

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótido ZC44341

<400> 29

gatgggtaga ggtacgcaga gacaggttac catcagcaac g 41

<210> 30

15 <211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC49249

20 <400> 30

gaaataattt tgtattacat taagaaggag atatatatat gaaaccaacc accactggta 60
aagg 64

<210> 31

<211> 65

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC45403

<400> 31

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ttaggtagat tccggatggg 60
tagag, 65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un polipéptido de IL-29 que comprende:
- (a) cultivar una célula hospedadora de *E. coli ompT* deficiente y/o *fhuA* deficiente que comprende un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos de manera operable:
- (i) un promotor de la transcripción;
- (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-29 que comprende los restos de aminoácidos 1-182 de la SEQ ID NO: 2, los restos de aminoácidos 1-183 de la SEQ ID NO: 4, o los restos de aminoácidos 1-176 de la SEQ ID NO: 6; y
- (iii) un terminador de la transcripción
- en un primer medio de crecimiento en condiciones en las que el polipéptido de IL-29 codificado se expresa en un matraz con agitación a una DO600 de 5 a 20;
- (b) inocular un reactor de fermentación con de 1 a 5% v/v de medio del matraz de agitación que contiene las células hospedadoras;
- (c) cultivar las células hospedadoras en un segundo medio de crecimiento a un pH de 6,2 a 7,2, en el que una disolución de carbohidratos se alimenta al reactor de fermentación a las 6 a 8 horas de tiempo de fermentación transcurrido;
- (d) añadir un agente de inducción al reactor de fermentación a las 20 a 30 horas de tiempo de fermentación transcurrido; y
- (e) cosechar las células hospedadoras a de 48 a 56 horas de tiempo de fermentación transcurrido.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disolución de alimentación de carbohidratos comprende un glicerol o glucosa a una concentración a una concentración de 10 a 30 g/l de medio de crecimiento, y a una velocidad de alimentación de 5-15 gramos de glicerol o glucosa por litro por hora.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el vector de expresión comprende además un potenciador de la traducción.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el potenciador de la traducción es la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 13.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el agente de inducción de la etapa (d) es isopropil tiogalactopiranosido, preferiblemente en el que se añade isopropil tiogalactopiranosido al cultivo a una concentración de 0,5 mM a 2 mM.
6. Un procedimiento de recuperación de un polipéptido de IL-29 procedente de una célula de *E. coli ompT* deficiente y/o *fhuA* deficiente que comprende:
- (a) cultivar la célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos de manera operable:
- (i) un promotor de la transcripción;
- (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de IL-29 que comprende

los restos de aminoácidos 1-182 de la SEQ ID NO: 2, los restos de aminoácidos 1-183 de la SEQ ID NO: 4, o los restos de aminoácidos 1-176 de la SEQ ID NO: 6; y

(iii) un terminador de la transcripción;

en un medio de crecimiento en condiciones en las que se expresa el polipéptido de IL-29 codificado;

- 5 (b) añadir un agente de inducción para inducir la expresión del polipéptido de IL-29;
- (c) cosechar las células hospedadoras;
- (d) lisar las células hospedadoras;
- (e) centrifugar las células hospedadoras lisadas;
- (f) recuperar el aglomerado de los cuerpos de inclusión;
- 10 (g) solubilizar el aglomerado de los cuerpos de inclusión en clorhidrato de guanidina 4-6 M y ditiotreitól 10-50 mM durante 1-2 horas a 15-25°C, y
- (h) añadir el polipéptido de IL-29 solubilizado a un tampón de repliegue que comprende 0,05-0,5% de polietilenglicol, sal, arginina 0,5 M – 1,25 M y una mezcla de moléculas reducidas y oxidadas durante 1-26 horas a una temperatura de 4-30°C y un pH de 7,3-8,5, en el que el polipéptido de IL-29
- 15 solubilizado se repliega;
- (i) detener rápidamente la reacción de repliegue ajustando el pH a 5,5-6,5;
- (j) diluir la disolución replegada detenida rápidamente 1,5 a 10 veces en agua o tampón de baja fuerza iónica a pH 5-7; y
- (k) filtrar la disolución de repliegue diluida detenida rápidamente mediante filtros para eliminar el precipitado o las partículas.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que las células hospedadoras procariontas de la etapa (d) se lisan mediante homogeneización.
8. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que las células hospedadoras procariontas lisadas de la etapa (e) se centrifugan mediante centrifugación tanto discontinua como continua.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que el polipéptido de IL-29 de la etapa (h) se añade al tampón de repliegue a una concentración final de 0,05-3,0 mg/ml.
10. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que la mezcla de moléculas reducidas y oxidadas del tampón de repliegue se selecciona entre el grupo constituido por cisteína y cistina, ditiotreitól y cistina, glutatión reducido y glutatión oxidado, y ditiotreitól y glutatión oxidado.
- 30 11. Un procedimiento de purificación de un polipéptido de IL-29 que comprende:
- (a) proporcionar el polipéptido de IL-29 según la etapa (k) de la reivindicación 6;
- (b) cargar la disolución filtrada que comprende el polipéptido de IL-29 replegado de la etapa (a) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico equilibrada con acetato de sodio a pH 5,5;
- (c) eluir el polipéptido de IL-29 unido con cloruro de sodio en acetato de sodio, pH 5,5; y
- 35 (d) ajustar el eluato con sulfato de amonio a una concentración 1M, y pasar el eluato del polipéptido de IL-29 ajustado a través de un filtro de 0,45 µm.
12. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que el polipéptido de IL-29 se eluye de la columna de

intercambio catiónico para formar un combinado en cloruro de sodio aproximadamente 0,7 M – 0,8 M tras usar la elución en gradiente lineal de cloruro de sodio 0-2 M.

13. El procedimiento de la reivindicación 11 que comprende además:
- 5 (e) cargar el polipéptido de IL-29 de la etapa (d) en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba equilibrada con acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 5,5;
- (f) eluir el polipéptido de IL-29 con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1,5 M a acetato de sodio 50 mM sin sulfato de amonio, pH 5,5;
- (g) diluir el eluato aproximadamente 6 veces con agua o tampón de baja fuerza iónica y pasar el eluato del polipéptido de IL-29 diluido a través de un filtro de 0,2 μm o 0,45 μm .
- 10 14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que el polipéptido de IL-29 se eluye de la columna de cromatografía de interacción hidrófoba en sulfato de amonio aproximadamente 0,75 M a sulfato de amonio 0 M.
15. El procedimiento de la reivindicación 13 que comprende además:
- (h) cargar el polipéptido de IL-29 de la etapa (g) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento equilibrada con acetato de sodio 50 mM que comprende cloruro de sodio
- 15 0-300 mM, pH 5,5; y
- (i) eluir el polipéptido de IL-29 con una concentración mayor de cloruro de sodio en acetato de sodio 50 mM, pH 5,5, en una etapa o formato de elución en gradiente.
16. El procedimiento de la reivindicación 15 en el que el polipéptido de IL-29 se eluye de la columna de cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento en cloruro de sodio aproximadamente 0,4 M a cloruro de
- 20 sodio 0,6 M tras usar una elución en gradiente de cloruro de sodio de 300 a 800 mM.
17. Un procedimiento de concentración de un polipéptido de IL-29 que comprende:
- (a) proporcionar el polipéptido de IL-29 según la etapa (i) de la reivindicación 15;
- (b) añadir el polipéptido de IL-29 a una placa de filtración en flujo tangencial y un sistema de soporte que comprende una o más membranas con un corte de pesos moleculares de 3-10 kDa;
- 25 (c) aplicar una presión transmembrana de 15-25 psi (103,4-172,4 kPa) al sistema para ultrafiltrar la disolución a una concentración mayor; y
- (d) filtrar el polipéptido de IL-29 concentrado a través de una membrana de 0,2 μm .
18. Un procedimiento de monopegilación de un polipéptido de IL-29 que comprende:
- (a) proporcionar 3-5 g/l del polipéptido de IL-29 producido mediante cualquier reivindicación anterior en
- 30 una disolución de tampón de acetato de sodio;
- (b) añadir cianoborohidruro de sodio 10-20 mM a la disolución de la etapa (a);
- (c) añadir un exceso molar de 2 veces de polietilenglicol derivatizado a la disolución de la etapa (b); y
- (d) mezclar la disolución de la etapa (c) durante 10-18 horas a 16-20°C.
19. Un procedimiento de purificación de un polipéptido de IL-29 monopegilado que comprende:
- 35 (e) proporcionar el polipéptido de IL-29 monopegilado según la etapa (d) de la reivindicación 18;
- (f) diluir la disolución de la etapa (e) 2 veces con acetato de sodio 50 mM, pH 5,5;
- (g) filtrar la disolución de la etapa (f) a través de una membrana de 0,2 μm .

(h) cargar la disolución de la etapa (g) en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento equilibrada con acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 5,5;

(i) eluir el polipéptido de IL-29 monopegilado de la columna de cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento con un gradiente lineal de acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5,5;

(j) añadir el polipéptido de IL-29 monopegilado a una placa de filtración en flujo tangencial y un sistema de soporte que comprende una o más membranas con un corte de pesos moleculares de 3-10 kDa;

(k) aplicar una presión transmembrana de 15-25 psi (103,4-172,4 kPa) al sistema para ultrafiltrar la disolución a una concentración mayor;

(l) usar el sistema para intercambiar el tampón del polipéptido de IL-29 concentrado en un tampón de formulación apropiado mediante diafiltración; y

(m) filtrar el polipéptido de IL-29 monopegilado concentrado a través de una membrana de 0,2 µm.

20. El procedimiento de la reivindicación 19 en el que el polietilenglicol comprende mono-metoxiPEG-propionaldehído de 20 kDa o 30 kDa.

21. El procedimiento de la reivindicación 19 en el que el polietilenglicol está unido en el extremo N con el polipéptido de IL-29.

22. El procedimiento de la reivindicación 15 o la reivindicación 17 en el que el polipéptido de IL-29 tiene al menos un 98% de pureza según análisis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y los agregados son menos de un 0,2% según HPLC de exclusión por tamaño.

23. El procedimiento de la reivindicación 17 en el que el polipéptido de IL-29 tiene un nivel de endotoxina de menos de 10 unidades de endotoxina por miligramo de polipéptido de IL-29 en un ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* basado en USP <85>.

24. El procedimiento de la reivindicación 18 en el que el polipéptido de IL-29 monopegilado está al menos un 99% monopegilado según se midió mediante HPLC en fase inversa.

25. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el vector de expresión comprende además un potenciador de la traducción.

26. El procedimiento de la reivindicación 25 en el que el potenciador de la traducción es la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 13.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

5 Documentos de patente citados en la descripción

- WO 02086087 A [0002]
- WO 2005023862 A [0005]
- CN 1670033 [0006]
- US 700905 P [0054]

10

- US 60700951 P [0054]
- WO 03066002 A, Kotenko [0054]
- WO 02092762 A, Baum [0054]
- US 6927040 B [0055] [0066]
- US 7038032 B [0055] [0066]

15

- WO 04037995 A [0055] [0066]
- WO 05023862 A [0055] [0066]
- US 20050244423 A [0055] [0066]
- US 2006012644 A [0055] [0066]
- US 458945 A [0055] [0066]

20

- US 489894 A [0055] [0066]
- US 6207442 B [0077]
- EP 0154316 A [0120]
- US 5382657 A, Karasiewicz [0120]
- US 60723544 B [0200]

25 Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Sheppard et al. Nature Immunol., 2003, vol. 4, 63-68 [0002]
- Sheppard P. et al. Nature Immunology, January 2003, vol. 4 (1), 63-68 [0007]
- Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0018]
- Lisset, S. ; Margalit, H. Nucleic Acids Res., 1993, vol. 21, 1512 [0018]

30

- Nilsson et al. EMBO J., 1985, vol. 4, 1075 [0032]
- Nilsson et al. Methods Enzymol., 1991, vol. 198, 3 [0032]
- Smith ; Johnson. Gene, 1988, vol. 67, 31 [0032]
- Grussenmeyer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, vol. 82, 7952 [0032]
- Hopp et al. Biotechnology, 1988, vol. 6, 1204 [0032]

35

- Ford et al. Protein Expression and Purification, 1991, vol. 2, 95 [0032]
- Smith HW. Infect Dis., May 1978, vol. 137 (5) [0069]
- Bogosian G. et al. Adv Appl Microbiol., 1991, vol. 36, 87-131 [0069]
- Bogosian G. et al. Appl Environ Microbiol., November 1996, vol. 62 (11), 4114-20 [0069]
- Heitkamp M.A. et al. J Ind. Microbiol., July 1993, vol. 11 (4), 243-52 [0069]

40

- Bogosian G. et al. J Ind Microbiol., July 1993, vol. 11 (4), 235-41 [0069]
- Bogosian G. et al. J Ind Microbiol., January 1992, vol. 9 (1), 27-36 [0069]
- Kane J.F. et al. Trends Biotechnol., vol. 6, 95-101 [0069]
- Kane J.F. et al. Surface reactive peptides and polymers: discovery and commercialization. American Chemical Society Books [0069]

45

- White C.B. et al. J Biol Chem., 02 June 1995, vol. 270 (22), 12990-4 [0070]
- Dekker N. et al. Biochemistry, 13 February 2001, vol. 40 (6), 1694-701 [0070]
- Ogata S. et al. Uirusu, June 2000, vol. 50 (1), 17-26 [0071]
- Moeck G.S. et al. J Bacteriol., November 1995, vol. 177 (21), 6118-25 [0071]
- Datsenko KA ; Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR

50

- products. Proc Natl Acad Sci U S A., 06 June 2000, vol. 97 (12), 6640-5 [0072]
- Murphy KC ; Campellone KG ; Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in Escherichia coli. Gene, 04 April 2000, vol. 246 (1-2), 321-30 [0072]
- Yu D; Ellis HM ; Lee EC ; Jenkins NA ; Copeland NG ; Court DL. An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A., 23 May 2000, vol. 97 (11), 5978-83 [0072]

55

- New England Biolabs 2005-6 Catalog. 2005, 270 [0073]
- Hill CW ; Gray JW. Genetics., August 1988, vol. 119 (4), 771-778 [0073]
- Parekh BS ; Hatfield GW. J Bacteriol., March 1997, vol. 179 (6), 2086-2088 [0073]
- White et al. J Biol. Chem., 02 June 1995, vol. 270 (22), 12990-4 [0073]
- Dekker et al. Biochemistry, 13 February 2001, vol. 40 (6), 1694-701 [0073]

60

- Ogata et al. Uirusu., June 2000, vol. 50 (1), 17-26 [0073]
- Moeck et al. J Bacteriol., November 1995, vol. 177 (21), 6118-25 [0073]
- Luo et al. Arch. Biochem. Biophys., 1996, vol. 329, 215 [0075]
- Morganti et al. Biotechnol. Appl. Biochem., 1996, vol. 23, 67 [0075]
- Zheng et al. Gene, 1997, vol. 186, 55 [0075]

- Ansel et al. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1995, 8-88-9 [0076]
- Adang et al. Plant Molec. Biol., 1993, vol. 21, 1131 [0076]
- Bambot et al. PCR Methods and Applications, 1993, vol. 2, 266 [0076]
- Use of the Polymerise Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes. Dillon et al. Methods in
- 5 Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humana Press, Inc, 1993, vol. 15, 263-268 [0076]
- Holowachuk et al. PCR Methods Appl., 1995, vol. 4, 299 [0076]
- Glick ; Pasternak. Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA. ASM Press, 1994 [0078]
- 10 • Itakura et al. Annu. Rev. Biochem., 1984, vol. 53, 323 [0078]
- Climie et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, 633 [0078]
- Kaufman. Meth. Enzymol., 1990, vol. 185, 487 [0080]
- Kaufman. Meth. Enzymol., 1990, vol. 185, 537 [0080]
- Gerdes, K. et al. Genetic Engineering, 1997, vol. 19, 49-61 [0080]
- 15 • Molecular Biology Labfax. Academic Press, 1991 [0081]
- Bacillus Cloning Methods. Hardy. DNA Cloning: A Practical Approach. IRL Press, 1985 [0081]
- Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1995 [0081]
- Wu et al. Methods in Gene Biotechnology. CRC Press, Inc, 1997 [0081]
- Meerman et al. Biotechnology, 1994, vol. 12, 1107-1110 [0081]
- 20 • Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0082]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc, 1987 [0082]
- Delgado et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1992, vol. 9, 249 [0120]
- Duncan ; Spreafico. Clin. Pharmacokinet, 1994, vol. 27, 290 [0120]
- Francis et al. Int J Hematol, 1998, vol. 68, 1 [0120]
- 25 • R. Nachum ; R. N. Berzofsky. J. Clinical Microbiology, May 1985, vol. 21 (5), 759-763 [0134]