

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 088**

51 Int. Cl.:
C07K 14/565 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05804508 .9**
96 Fecha de presentación: **02.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1809661**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **MUTEÍNA DE INTERFERÓN BETA HUMANO.**

30 Prioridad:
02.11.2004 KR 20040088196

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.11.2011

73 Titular/es:
**SHIN, YOUNG KEE
NO 122C-502 SEOULDAEGYOSU APT. SAN4-2,
BONGCHEON-DONG, GWANA-GU
SEOUL 151-050, KR**

72 Inventor/es:
**SO, Moon Kyoung;
LEE, Jong-Min;
YANG, Ji-Hye;
SONG, Kyung;
JIN, Jae Ho;
SHIN, Young Kee;
OH, Han Kyu;
KIM, Ji Tai;
AHN, Ji Soo;
YOO, Ji Uk;
BYUN, Tae Ho y
YOON, Ho Chul**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

ES 2 369 088 T3

DESCRIPCIÓN

Muteína de interferón beta humano

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una muteína de interferón beta humano. En particular, la presente invención se refiere a la muteína de interferón beta humano que tiene una o dos cadenas adicionales de azúcar comparado con el interferón beta humano natural.

10

Antecedentes de la invención

El interferón (IFN) que es un miembro de las citoquinas muestra actividad antivírica, suprime la proliferación celular y regula la respuesta inmune natural. El interferón beta (IFN- β) es una proteína esférica que tiene 5 hélices y tiene un peso molecular de 22 kDa que se convierte en 18 kDa cuando se elimina su cadena de azúcar (Arduini et al., Protein Science 8: pp. 1867-1877, 1999).

15

El interferón beta se ha estudiado activamente por sus aplicaciones clínicas, y en particular, ha sido el centro de atención como agente para el alivio, mitigación o tratamiento de síntomas de esclerosis múltiple (Goodkin et al., Multiple sclerosis: Treatment options for patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis, 1999).

20

Además de la esclerosis múltiple, se ha descrito que el interferón beta muestra diversas actividades inmunológicas tales como actividad antivírica, inhibición del crecimiento celular o actividad anti-crecimiento, aumento de la linfotoxicidad, actividad inmunorreguladora, inducción o supresión de la proliferación de células diana, activación de macrófagos, aumento de la producción de citoquinas, aumento del efecto de células T citotóxicas, aumento de las células citolíticas naturales y, por tanto, se usa de forma eficaz para el tratamiento de cáncer, trastornos autoinmunes, infecciones víricas, enfermedades relacionadas con VIH, hepatitis C, artritis reumatoide y similares (Pilling et al., European Journal of Immunology 29: pp. 1041-1050, 1999, Young et al., Neurology 51: pp. 682-689, 1998; Cirelli et al., Major therapeutic uses of interferons. Clin Immunother 3: pp. 27-87, 1995).

25

30

El interferón beta humano es un tipo de glicoproteína unido a una o más cadenas de azúcar, y tal cadena de azúcar desempeña un papel importante en la actividad de la glicoproteína.

35

Por tanto, hay un ejemplo donde la actividad de una glicoproteína aumenta cuando se introduce adicionalmente una cadena de azúcar en la misma.

La publicación de PCT No. WO96/25498 y la patente de EE UU No. 5.618.698 han divulgado que las actividades de las glicoproteínas hTPO y hEPO aumentan al introducir una o más cadenas de azúcar.

40

El documento WO 2004019856 se refiere a una isoforma de interferón alfa humano con aminoácido modificado que tiene al menos una de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) formada en un sitio específico de modo que la glicosilación tiene lugar en este sitio y un gen que codifica la misma, un vector de expresión que comprende el gen, y un método para producir la isoforma alfa de interferón humano glicosilada mediante la transformación o transfección de una célula eucariota con el vector de expresión, cultivo de la célula transfectada o transformada y aislamiento de la isoforma alfa del interferón humano glicosilada del cultivo, la isoforma alfa de interferón humano glicosilada producida a partir del mismo y una composición farmacéutica que comprende la misma.

45

La presente invención ha divulgado una muteína de interferón beta humano que tiene actividad o capacidad aumentada o mejorada al introducir una cadena de azúcar en el interferón beta humano natural, como un punto de vista descrito anteriormente.

50

Según esto, en una forma de realización de la presente invención, se proporciona una muteína de interferón beta humano que tiene actividad o capacidad aumentada o mejorada al introducir una cadena de azúcar en un interferón beta humano natural.

55

Otros objetos o formas de realización según la presente invención se proporcionan en el presente documento posteriormente.

60 Descripción detallada de la invención

En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a una muteína de interferón beta humano.

Puesto que la muteína de interferón beta humano de la presente invención toma la forma de introducir una o dos cadenas adicionales de azúcar al interferón beta natural, muestra actividad antivírica, actividad de supresión del

65

crecimiento celular, capacidad inmunorreguladora mejoradas o aumentadas y semivida *in vivo* prolongada (véanse las figuras 7 a 10).

5 Como se describe en los siguientes ejemplos, en el caso de expresar el polipéptido en el que se ha sustituido el aminoácido 27, arginina (R) en el interferón beta humano natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con treonina (T) o serina (S) o se ha añadido una secuencia glicina-asparragina-isoleucina-valina (G-N-I-T-V) al extremo C-terminal del interferón beta humano natural en una célula animal, la presente invención puede preparar una muteína de interferón beta humano que tiene actividad o capacidad mejorada o aumentada comparada con el interferón beta humano natural al introducir una o dos cadenas adicionales de azúcares N-unidas en el interferón beta natural.

10 La presente invención se proporciona basándose en estos resultados experimentales.

15 La muteína de interferón beta humano que tiene actividad o capacidad aumentada o mejorada comparado con el interferón beta humano natural se caracteriza por la inclusión de la secuencia glicina-asparragina-isoleucina-valina (G-N-I-T-V) en el extremo C-terminal en la secuencia de aminoácidos del interferón beta humano natural o una muteína de interferón beta humano natural y que tiene una cadena de azúcar N-unida en esa posición de secuencia.

20 El término "muteína de interferón beta humano natural" usado en el presente documento incluyendo las reivindicaciones significa todos los polipéptidos que tienen una parte de o la secuencia de aminoácidos completa derivada del interferón beta humano natural que mantiene la actividad de interferón beta humano.

25 El término "actividad de interferón beta humano" usado en el presente documento significa una o más actividades suficientes para definir un polipéptido como interferón beta humano entre las actividades previamente conocidas que muestra el interferón beta humano. Tales actividades incluyen actividad para aliviar, mitigar o tratar esclerosis múltiple, actividad antivírica, inhibición del crecimiento celular, actividad anticrecimiento, anti-proliferación, aumento de linfotoxicidad, actividad inmunorreguladora, inducción o supresión de la proliferación de células diana, aumento de la producción de citoquinas, aumento del efecto de células T citotóxicas, aumento de células citolíticas naturales, actividad para prevenir o tratar cáncer, prevención o tratamiento de trastornos autoinmunes, prevención o tratamiento de infecciones víricas, prevención o tratamiento de enfermedades relacionadas con VIH, prevención o tratamiento de hepatitis C y prevención o tratamiento de artritis reumatoide.

35 Además, el término "polipéptido que tiene una parte de o la secuencia de aminoácidos completa derivada del interferón beta humano natural" usada en el presente documento significa un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos completa del interferón beta humano natural representada por SEQ ID NO: 1 o una parte esencial de la misma, o un polipéptido sustancialmente similar a tal polipéptido.

40 El término "polipéptido que incluye una parte esencial del total de aminoácidos de SEQ ID NO: 1" usada en el presente documento significa un polipéptido que muestra actividad relativamente menor que el interferón beta humano natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, pero contiene una parte de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que todavía tiene la actividad de interferón beta humano. Además, el término "polipéptido sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1 o una parte esencial de la misma" usado en el presente documento significa un polipéptido que muestra actividad relativamente menor que el interferón beta humano natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, pero contiene la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1 o una parte esencial de la misma que tiene uno o más aminoácidos sustituidos y que tiene aún la actividad de interferón beta humano.

45 Por ejemplo, el polipéptido que incluye una parte esencial de la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1 puede ser un polipéptido al que se ha delecionado su extremo N-terminal y/o C-terminal en el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Además, el polipéptido sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1 o una parte esencial de la misma se ejemplifica por un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos sustituidos en donde el aminoácido sustituido es químicamente equivalente al aminoácido original antes de la sustitución. Por ejemplo, en el caso de un aminoácido hidrofóbico tal como alanina, es preferible sustituirla con otro aminoácido hidrofóbico tal como glicina, o aminoácidos más hidrofílicos tales como valina, leucina o isoleucina que el aminoácido original.

50 Algunas veces, puesto que el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el aminoácido sustituido pueden influir sobre un motivo esencial para la actividad de interferón beta humano, hay casos donde el polipéptido al que se delecciona su extremo N-terminal y/o extremo C-terminal o que tiene un aminoácido sustituido no muestra ninguna actividad de interferón beta humano. Sin embargo, confirmar si un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 tiene una o más actividades entre las actividades descritas anteriormente, y/o mediante un método bien conocido en la técnica relacionado con la identificación de interferón beta humano basado en el momento de una fecha de presentación de la presente invención, clasificar y detectar un polipéptido activo de tales polipéptidos inactivos pertenece a la gama de capacidad convencional de un experto en la materia.

65

Considerando en conjunto la descripción anterior, la muteína de interferón beta humano de la presente invención se define según la reivindicación 1.

5 Por tanto, se debe entender que la muteína de interferón beta humano de la presente invención es un polipéptido que tiene la actividad de interferón beta humano que contiene una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina en su extremo C-terminal y tiene una cadena de azúcar N-unida en esa posición de secuencia.

10 Asimismo, aunque la muteína de interferón beta humano de la presente invención se define y entiende como todos los polipéptidos que muestran la actividad de interferón beta humano que contienen una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina en el extremo C-terminal y tienen una cadena de azúcar N-unida en esa posición de secuencia, la muteína de interferón beta humano preferida de la presente invención es un polipéptido que contiene una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina en el extremo C-terminal del interferón beta humano natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y tiene una cadena de azúcar N-unida en esa posición de secuencia.

15 Además, la muteína de interferón beta humano preferida de la presente invención es un polipéptido sustancialmente similar al polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos entera de SEQ ID NO: 1 o una parte esencial de la misma (correspondiente al polipéptido anterior (C)). Tal polipéptido contiene dos cadenas de azúcar N-unidas: una está localizada en la secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina de su extremo C-terminal, y la otra está localizada en la secuencia de aminoácidos del 25 al 28 de SEQ ID NO: 1 que consiste en asparagina-glicina-treonina/serina-leucina, que está modificada por sustitución del aminoácido 27 arginina de SEQ ID NO: 1 con treonina o serina.

20 La forma más preferida en las muteínas de interferón beta humano de la presente invención es un polipéptido que contiene una cadena de azúcar N-unida en la posición donde el aminoácido 27 arginina de SEQ ID NO: 1 se sustituye con treonina o serina, y contiene otra cadena de azúcar N-unida en la posición donde la secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina se añade al extremo C-terminal.

30 Los siguientes ejemplos de la presente invención muestran que la muteína de interferón beta humano con dos cadenas de azúcar adicionales introducidas muestra actividad o capacidad mejorada o aumentada más que la muteína con solo una cadena de azúcar adicional introducida comparadas con el interferón beta humano natural (véanse los ejemplos 5 y 6 y las figuras 7 a 10).

35 Mientras tanto, la muteína de interferón beta humano de la presente invención se puede definir de una manera diferente como la que sigue.

40 En particular, la muteína de interferón beta humano de la presente invención se puede definir como un polipéptido que muestra la actividad de interferón beta humano como uno de los siguientes polipéptidos en el que se introduce una cadena adicional de azúcar N-unida en la posición donde las secuencias de aminoácidos del 25 al 28 de SEQ ID NO: 2 que consiste en asparagina-glicina-treonina/serina-leucina están conservadas:

- (a) un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos entera de SEQ ID NO: 2;
- (b) un polipéptido que incluye una parte esencial de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
- (c) un polipéptido sustancialmente similar a los polipéptidos (a) o (b).

45 El párrafo "las secuencias de aminoácidos del 25 al 28 que consisten de asparagina-glicina-serina/treonina-leucina están conservadas" usado en el presente documento incluyendo las reivindicaciones significa que las secuencias de los aminoácidos 25 al 28 que consisten en asparagina-glicina-treonina/serina-leucina deben estar presentes en el polipéptido (b) o (c) (es decir, el polipéptido que incluye una parte esencial de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o el polipéptido sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos entera o una parte esencial de SEQ ID NO: 2).

50 Cuando la muteína de interferón beta humano de la presente invención se define de una manera diferente a como se ha descrito anteriormente, la muteína de interferón beta humano preferida de la presente invención es un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos entera de SEQ ID NO: 2 en la que se introduce una cadena de azúcar N-unida adicional en la posición de las secuencias de aminoácidos del 25 al 28 que consiste en asparagina-glicina-treonina/serina-leucina.

55 La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 es la secuencia en la que se sustituye el aminoácido 27 arginina en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con treonina o serina.

60 Mientras tanto, el término "polipéptido que incluye una parte esencial de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2" o "polipéptido sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos completa o una parte esencial de SEQ ID NO: 2" tiene el mismo significado que se ha descrito anteriormente.

65

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica la muteína de interferón beta humano como se ha descrito anteriormente.

5 El término "muteína de interferón beta humano como se ha descrito anteriormente" incluye las muteínas de interferón beta humano de la presente invención como se han definido anteriormente de dos maneras diferentes y todas las formas de realización preferidas de cada una de las mismas.

10 Cuando se da una cierta secuencia de aminoácidos, el experto en la materia puede sintetizar fácilmente un polinucleótido que codifique la cierta secuencia de aminoácidos basándose en la secuencia dada empleando sus técnicas convencionales.

El término "polinucleótido" usado en el presente documento se define como el significado incluyendo todos los ARN o ADN monocatenarios o bicatenarios o un polímero de los mismos.

15 Mientras tanto, cuando se considera la actividad, el polinucleótido anterior es preferible que sea un polipéptido que codifica la muteína de interferón beta humano en el que se introduce una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina en el extremo C-terminal del interferón beta humano natural que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o un polinucleótido que codifica la muteína de interferón beta humano de SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, el polinucleótido es un polinucleótido que codifica la muteína de interferón beta humano en la que se introduce la secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina en el extremo C-terminal del interferón beta humano natural que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que tiene la sustitución del aminoácido 27 arginina con treonina o serina.

25 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión en células animales que comprende el polinucleótido descrito anteriormente que es capaz de expresar la muteína de interferón beta humano de la presente invención en la célula animal.

30 La muteína de interferón beta humano de la presente invención incluye una o dos cadenas adicionales de azúcar comparada con el interferón beta humano natural. Cuando se considera el hecho de que la adición de tales cadenas de azúcar es un fenómeno que se produce en general en una célula animal, el vector de expresión en células animales fundamentalmente comprende:

- (i) el polinucleótido que codifica la muteína de interferón beta humano como se ha descrito anteriormente;
- (ii) un promotor operativamente unido a la secuencia de nucleótidos de (i) que genera una molécula de ARN;
- (iii) un polinucleótido que codifica una secuencia líder;
- (iv) un origen de replicación; y
- (v) una región 3' no traducida (3'-UTR) que produce la poliadenilación del extremo 3'-terminal de la molécula de ARN.

40 El promotor utilizable en la presente invención significa la secuencia capaz de activar transcripción, que se conoce bien en la técnica. De forma similar, la secuencia líder que produce la translocación de una proteína traducida al retículo endoplásmico donde se produce la glicosilación y la 3'-UTR capaz de estabilizar la secuencia líder y el ARN se conocen bien en la técnica.

45 Mientras tanto, el vector de expresión de la presente invención puede comprender selectivamente un gen indicador (por ejemplo, luciferasa y β -glucuronidasa) o un gen de resistencia a antibiótico como marcador selectivo (por ejemplo, neomicina, carbenicilina, kanamicina, espectinomycin, higromicina) y puede comprender además un potenciador.

50 Mientras tanto, el vector de expresión en células animales utilizable en la presente invención incluye pSV2-neo (Southern y Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341, 1982), pCAGGS (Niwa et al., Gene 108: 193-200, 1991), pcDL-SR α 296 (Takebe et al., Mol. Cell Biol. 8: 466-472, 1988), pAc373 (Luckow et al., Bio/Technology 6: 47-55, 1988) y tales vectores enumerados anteriormente pueden comprender un promotor, secuencia líder, origen de replicación, 3'-UTR, gen indicador, gen marcador de selección y/o potenciador descritos anteriormente si lo exigen las circunstancias.

55 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una célula animal transformada con el vector de expresión y a un método para la producción de una muteína de interferón beta humano mediante el cultivo de la célula animal.

60 El término "transformación" usado en el presente documento incluyendo las reivindicaciones significa la modificación del genotipo de una célula huésped mediante la introducción de un polinucleótido exógeno (en la presente invención, que significa un polinucleótido que codifica la muteína de interferón beta humano), y significa la introducción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped independientemente del método de transformación usado. El polinucleótido exógeno introducido en una célula huésped se puede mantener con o sin la integración en el genoma de la célula huésped, y la presente invención incluye ambos casos.

Mientras tanto, el término “célula animal” usado en el presente documento incluye todas las células animales y células de insecto utilizables en la producción de una proteína recombinante. Células animales de ejemplo utilizables en la presente invención incluyen células COS, células CHO, células C-127, células BHK, células Hep I de rata, células Hep II de rata, células TCMK, neumocitos humanos, células de hepatoma humano, células HepG2, hepatocitos de ratón, células DUKX, células 293 etcétera, y la célula de insecto se ejemplifican por células en cultivo de gusano de seda.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la muteína de interferón beta humano según la presente invención.

El interferón beta humano incluido en la composición farmacéutica de la presente invención se ha usado en general como un agente terapéutico para esclerosis múltiple, pero también se ha descrito que se puede usar para tratar cáncer, trastornos autoinmunes, infecciones víricas, enfermedades relacionadas con VIH y hepatitis C (Pilling et al., European Journal of Immunology 29: 1041-1050, 1999) y su nuevo efecto farmacológico se ha descubierto continuamente.

Por tanto, se debe entender que el efecto farmacológico en la composición farmacéutica de la presente invención incluye todos los otros efectos farmacológicos que muestra el interferón beta humano así como el efecto farmacológico como un agente terapéutico para esclerosis múltiple.

Además, se debe entender que tal efecto farmacológico incluye cualquier efecto farmacológico que se descubra en el futuro así como todos los efectos farmacológicos descritos hasta ahora como el efecto farmacológico de interferón beta humano.

Puesto que la composición farmacéutica de la presente invención se caracteriza por comprender la muteína de interferón beta humano que tiene actividad o capacidad mejorada o aumentada preparada según el método de la presente invención, aunque la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir cualquier efecto farmacológico de interferón beta humano que se descubra en el futuro así como todos sus efectos farmacológicos descritos hasta ahora, el ámbito de la presente invención no se debe aumentar excesivamente.

Sin embargo, cuando se considera el hecho de que el interferón beta humano se ha usado ampliamente como agente terapéutico para esclerosis múltiple y sus efectos terapéuticos para cáncer, trastornos autoinmunes, infecciones víricas, enfermedades relacionadas con VIH y hepatitis C se han descubierto previamente, el efecto farmacológico anterior es preferible que sea tales efectos farmacológicos.

Mientras tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por varias vías incluyendo introducción oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa e intramuscular.

La composición farmacéutica inventiva se puede formular en varios tipos de formulaciones según cualquiera de los procedimientos convencionales. Al preparar la formulación, el principio activo preferiblemente se mezcla o diluye con diluyentes tales como rellenos, dilatadores, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes y tensioactivos o excipientes.

Para tratar un paciente humano, una dosis diaria típica de la composición farmacéutica inventiva puede variar desde alrededor de 0,01 hasta 5 mg/kg de peso corporal, y se puede administrar en una dosis única o en dosis divididas. Sin embargo, se debe entender que la cantidad del principio activo que realmente se administra se debe determinar a la luz de varios factores relevantes incluyendo la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, la edad, sexo y peso corporal del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente; y, por tanto, no se debe pretender que la dosis anterior limite el ámbito de la invención en modo alguno.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica un interferón beta humano y la secuencia de aminoácidos codificada en la misma. La secuencia de aminoácidos que se sustituye de forma artificial se representa como una caja.

La figura 2 es un esquema que muestra el procedimiento de modificar de forma artificial el gen que codifica el interferón beta humano en un sitio específico mediante mutagénesis dirigida. En el primer paso, el par de cebadores sintetizado se une al sitio específico de la secuencia de nucleótidos y sintetiza un nuevo gen que tiene la secuencia de nucleótidos sustituida por la acción de la ADN polimerasa. En el segundo paso, el gen molde de interferón beta metilado en la mezcla de reacción de PCR que contiene el gen de interferón beta recién sintetizado se elimina mediante tratamiento con la enzima de restricción DpnI, y la mezcla de reacción de PCR resultante se transforma en *E. coli*.

La figura 3 es un esquema que muestra el procedimiento de ensamblaje del vector de expresión pcDNA3.1-IFN-β para la expresión de una muteína de interferón beta humano.

5 La figura 4 es un esquema que muestra el procedimiento de cotransfección de un vector de expresión pcDNA3.1-IFN-β y psp72-DHFR en una célula animal para la expresión de una muteína de interferón beta humano.

10 La figura 5 muestra el resultado de una inmunotransferencia que analiza la expresión de muteínas de interferón beta humano en células COS. Además, también muestra el resultado de una inmunotransferencia que analiza las muteínas después del tratamiento con N-glicanasa. Como anticuerpo primario se usa un anticuerpo monoclonal específico para interferón beta humano y como anticuerpo secundario se usa un anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a HRP.

15 La figura 6 muestra el resultado de SDS-PAGE que analiza las muteínas de interferón beta humano purificadas de una solución de cultivo de células CHO.

La figura 7 muestra el resultado de comparar las actividades antivíricas de las muteínas de interferón beta expresadas en células CHO con la del interferón beta natural.

20 La figura 8 muestra el resultado de comparar el efecto inhibitor sobre crecimiento celular de las muteínas de interferón beta expresadas en células CHO con la del interferón beta natural.

25 La figura 9 muestra el resultado de medir los efectos inmunorreguladores de las muteínas de interferón beta expresadas en células CHO e interferón beta natural mediante la activación de MHC de clase I en células A549 y comparándolas.

La figura 10 muestra las concentraciones residuales en sangre de las muteínas de interferón beta expresadas en células CHO e interferón beta natural en ratas según una evolución temporal.

30 Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren adicionalmente la presente invención y no se deben interpretar como limitantes del ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: Síntesis de un gen que codifica una muteína de interferón beta humano que tiene una o más secuencias Asn-X-Ser/Thr adicionales mediante mutagénesis

35 Para modificar de forma artificial R27 (la secuencia del aminoácido 27, arginina) en la secuencia de aminoácidos de interferón beta humano (IFN-β) presentada por SEQ ID NO: 1 (figura 1) a treonina (T) o serina (S), o para añadir una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina (G-N-I-T-V) al extremo C-terminal de IFN-β, se llevaron a cabo mutagénesis dirigida y síntesis de ADN usando un gen que codifica interferón beta natural de SEQ ID NO: 3 como molde.

40 Esto es, se sintetizaron una serie de pares de cebadores que se dirigían al sitio que se iba a someter a mutagénesis. En este punto, los pares de cebadores usados en PCR solapante para sintetizar un gen que codifica una muteína de interferón beta fueron como sigue:

- 45 i) un par de cebadores para sintetizar R27T
R27T-5': GCAATTGAATGGGACGCTTGAATACTGCCTC (SEQ ID NO: 4)
R27T-3': GAGGCAGTATTCAAGCGTCCCATTCAATTGC (SEQ ID NO: 5)
- ii) un par de cebadores para sintetizar R27S
R27S-5': GCAATTGAATGGGAGTCTTGAATACTGCCTC (SEQ ID NO: 6)
50 R27S-3': GAGGCAGTATTCAAGACTCCCATTCAATTGC (SEQ ID NO: 7)
- iii) un par de cebadores para sintetizar GNITV
GNITV-5': CTTACAGTTACCTCCGAAACGGTAATATCACTGTCTGAAGATCTCCTAGCCTGTCC (SEQ ID
NO: 8)
GNITV-3': GAATGTCCAATGGAGGCTTTGCCATTATAGTGACAGACTTCTAGAGGATCGGACAGG (SEQ
55 ID NO: 9)

60 (en donde R27T y R27S son los genes que codifican las muteínas de interferón beta que tienen la sustitución de arginina en la posición 27 con treonina y serina, respectivamente, a través de la mutagénesis de un gen de interferón beta, y GNITV es el gen que codifica la muteína a la que se añade una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina (G-N-I-T-V) en el extremo C-terminal a través de la mutagénesis de un gen de interferón beta. Los siguientes son iguales).

65 Como se muestra en la figura 2, se realizó la PCR usando el plásmido vector pGEM-T Easy (Promega, EE UU) que contenía el gen que codifica el interferón beta como molde, dos pares de cebadores solapantes y ADN polimerasa Pfu-turbo. Se preparó la solución de reacción de PCR mezclando 5 µl de una solución tampón de reacción 10x, de 5 a 50 ng de un gen molde, 125 ng de cada uno del par de cebadores y 1 µl de una mezcla de dNTP, el volumen final

se ajustó a 50 µl con agua ultrapura, y después, se añadió a la misma 1 µl de ADN polimerasa Pfu turbo (2,5 U/µl). Las condiciones de PCR fueron como sigue: 12 ciclos de 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C y 480 segundos a 68°C después de una desnaturalización inicial de 30 segundos a 95°C.

5 El producto de PCR se trató con 1 µl de DpnI (10 U/µl) a 37°C durante 4 horas para eliminar el gen molde metilado. Después se añadió 1 µl de producto de PCR tratado con DpnI a células de *E. coli* XL1-blue descongeladas en hielo, la mezcla se calentó a 42°C durante 45 segundos y se enfrió en hielo. Las células de *E. coli* preparadas de esta manera se resuspendieron en 500 µl de medio de cultivo, se incubaron a 37°C durante una hora y se sometieron a centrifugación para recoger las células. Las célula así recogidas se extendieron en una placa de LB agar, se
10 incubaron a 37°C durante 16 horas o más hasta que se generaron colonias. Después de purificar ADN de plásmido de la colonia, el gen que codifica una muteína de interferón beta se sometió a análisis de secuenciación usando un secuenciador de ADN. Como resultado, el aminoácido 27 se modificó al codón que codifica treonina (R27T) o serina (R27S) a través de mutagénesis dirigida. Además, se añadió el codón que codifica la secuencia de aminoácidos (GNITV) que consiste en glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina al extremo C-terminal del interferón beta
15 humano natural. Los plásmidos que contenían los genes preparados de esta manera se designaron pGEMT-IFN-β-R27T, pGEMT-IFN-β-R27S y pGEMT-IFN-β-GNITV, respectivamente.

Se realizó PCR usando como molde pGEMT-IFN-β-R27T y pGEMT-IFN-β-R27S, el par de cebadores solapantes (iii) específicos para GNITV y ADN polimerasa Pfu-turbo en las mismas condiciones, y el producto de PCR amplificado así se sometió a clonación como se ha descrito anteriormente. Como resultado, se obtuvo el gen que tenía la sustitución de alanina en la posición 27 con treonina o serina y la adición del codón que codifica la secuencia de aminoácidos que consiste en glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina. Los plásmidos que contenían tales genes se designaron pGEMT-IFN-β-R27T+GNITV y pGEMT-IFN-β-R27S+GNITV.
20

25 La tabla 1 muestra los plásmidos en los que se insertan 5 genes de muteínas de interferón beta preparados según la presente invención, respectivamente.

[Tabla 1]

Genes de muteínas de interferón beta		
Plásmido	Sustitución de aminoácido	Sustitución y adición
pGEMT-IFN-β-R27T	R27T	AGG → ACG
pGEMT-IFN-β-R27S	R27S	AGG → AGT
pGEMT-IFN-β-GNITV	GNITV	+GGTAATATCACTGTC
pGEMT-IFN-β-R27T+GNITV	R27T+GNITV	AGG → ACG +GGTAATATCACTGTC
pGEMT-IFN-β-R27S+GNITV	R27s+GNITV	AGG → AGT +GGTAATATCACTGTC

30 **Ejemplo 2: Construcción de un vector de expresión, transfección en células COS y cultivo celular**

Se llevó a cabo una PCR usando cada uno de los plásmidos que contenía la muteína de interferón beta preparados en el ejemplo 1 como molde y un par de cebadores de P1 (CCGGAATTCGCCACCATGACCAACAAGTGTCTCTCCAAA, SEQ ID NO: 10) y P2
35 (CCGCTCGAGGTCACCTAAACAGCATCTGCTGGTTGA, SEQ ID NO: 11), para obtener los genes que codifican interferón beta artificialmente sustituidos (figura 3). En este punto, se empleó ADN polimerasa (Stratagene) en esta reacción de PCR, y el gen amplificado tenía sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y XhoI en ambos extremos. Se trataron el gen de la muteína de IFN-β amplificado de esta manera y pcDNA3.1 (Invitrogen) con EcoRI y XhoI, respectivamente. El gen de la muteína de IFN-β y pcDNA3.1 linealizados se recuperaron de un gel de agarosa usando un kit de extracción de Qiagen, se sometieron a ligación, y después se transformaron en *E. coli* DH5α. Se purificó el ADN de plásmido de la colonia generada después de cultivar los transformantes de *E. coli*
40 en un medio LB-ampicilina agar, se trató con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, y después se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, para seleccionar la colonia en la que se había insertado solo el gen de la muteína de IFN-β. Se confirmó que el ADN de plásmido de la colonia seleccionada tiene la secuencia de nucleótidos del gen de la muteína de IFN-β mediante análisis de secuenciación. Tal plásmido se designó pcDNA3.1-IFN-β-X (en donde, X es un número de cada muteína de interferón beta).
45

Se transfectaron células COS (No. de la ATCC CRL-1650) con los vectores recombinantes de expresión correspondientes a interferón beta natural, muteínas de interferón beta R27T, R27S, R27T+GNITV y R27S+GNITV
50 entre los vectores recombinantes de expresión preparados, respectivamente. Esto es, las células COS precultivadas, se inocularon en una placa de cultivo de células de 60 mm a una concentración de 2x10⁵ células/ml y se incubaron durante 24 horas. Se añadieron 2 µg de cada ADN de vector recombinante de expresión y 7 µl de reactivo Lipofectin™ (Gibco BRL) a 100 µl de DMEM sin suero, respectivamente, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se mezclaron entre sí las dos soluciones así preparadas y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos, para formar un complejo lipofectina-ADN. Después de añadir DMEM sin suero al complejo lipofectina-ADN, la mezcla se echó suavemente sobre las células COS cultivadas en la placa, y la placa se incubó en un incubador a 37°C, con CO₂ al 5% durante 6 horas para que se produjera la transfección. Las células COS transfectadas con cada vector de expresión se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino
55

fetal (JRH) al 10%, penicilina 50 µg/ml y estreptomycin 50 µg/ml a 37°C, CO₂ al 5% durante 48 horas. Durante el cultivo, se recogió la solución de cultivo condicionada durante 3 a 5 días.

Ejemplo 3: Caracterización de la muteína de interferón beta

Ejemplo 3-1: Confirmación de la adición de la cadena de azúcar

El sobrenadante que contenía el interferón beta humano recombinante o la muteína de interferón beta se separó de la solución de cultivo de las células COS transfectadas preparadas en el ejemplo 2. Se mezclaron 1~2 µg del sobrenadante con un anticuerpo policlonal de conejo anti-interferón beta y se sometió a inmunoprecipitación a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió al sobrenadante que contenía el anticuerpo resina de proteína A sepharosa de 20 a 80 µl diluida con PBS (solución salina tamponada con fosfato) en un volumen igual, y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla se sometió a centrifugación para separar un precipitado, y el precipitado se lavó con PBS. Una parte del precipitado se trató con N-glicanasa para cortar una cadena de azúcar N-unida. Los precipitados tratados con y sin N-glicanasa se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15%. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-interferón beta según el método descrito por Runkel et al (*Pharmaceutical Research* 15: 641-649, 1998).

Como resultado del análisis del sobrenadante de las células COS transfectadas con cada una de las muteínas de interferón beta, se ha confirmado que el peso molecular de la proteína de la muteína de interferón beta aumenta comparado con el del interferón beta natural (figura 5). Cuando la muteína de interferón beta que tenía el peso molecular de la proteína aumentado se trató con N-glicanasa, la cadena de azúcar se eliminó, lo que produce un descenso en el peso molecular (figura 5).

Ejemplo 3-2: Comparación de la actividad de las muteínas de interferón beta

Para comparar las actividades del interferón beta natural y las muteínas de interferón beta, se cuantificó la cantidad de proteína interferón mediante EIA (inmunoensayo enzimático), y los títulos del interferón beta natural y muteínas de interferón beta se midieron a través de una prueba de actividad vírica.

El EIA se realizó usando un kit (PBL) según las instrucciones del fabricante. Es decir, se distribuyeron 100 µl de una solución de dilución en cada pocillo especificado en una placa de absorción de anticuerpo incluida en el kit de inmunoensayo enzimático. Se diluyeron una solución estándar internacional y las muestras con una solución de dilución a un índice de dilución adecuado y se añadieron 100 µl de cada uno de los diluyentes al pocillo. La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora. En este punto, la solución estándar internacional se preparó disolviendo una ampolla del estándar internacional de IFN-β (NIBSC) en 1 ml de tampón de formulación y se distribuyeron 100 µl de la solución resultante a un vial. El vial se almacenó a -70°C, y cuando se usó, el vial congelado se descongeló y el contenido se diluyó apropiadamente con una solución de dilución antes de su uso. Después de eliminar la solución de reacción residual de cada pocillo, la placa se lavó con 250 µl de una solución de lavado tres veces, y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución de conjugado enzima-anticuerpo. La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante una hora. Después de terminar la reacción, la solución de reacción se eliminó. La placa se lavó con 200 µl de una solución de lavado tres veces y la solución residual se eliminó por completo de la misma. Se añadieron después a cada pocillo 100 µl una solución anteriormente preparada de solución de sustrato colorante y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de completar la reacción, se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm. Se dibujó una curva patrón representando la concentración de la solución estándar en un eje horizontal y la absorbancia (A450 nm) de la misma en un eje transversal, y la concentración de IFN-β humano correspondiente a cada absorbancia de la solución estándar internacional y las muestras se calcularon de la curva patrón. Se determinó el valor medio de tres concentraciones de diluyente multiplicando la concentración calculada por cada índice de dilución, se calcularon los valores medidos de la solución estándar internacional y las muestras a partir de la misma, y después, se calculó la concentración final. La prueba de actividad antivírica se realizó según el mismo método que se describe en el ejemplo 6. La relación de título antivírico y valor de EIA en las varias soluciones de cultivo de células COS que expresaban de forma transitoria cada muteína de interferón beta se muestran en la tabla 2. A partir de estos resultados, se ha confirmado que el peso molecular de la muteína de interferón beta aumenta debido a la adición de cadenas de azúcar, y su actividad también es igual o mayor que la del interferón beta natural. Para la producción en masa de tal muteína de interferón beta, se transfectó el vector de expresión de la muteína de interferón beta descrito anteriormente en la línea celular CHO.

[Tabla 2]

Aumento en el peso molecular de la muteína de interferón beta y la relación de título antivírico y valor de EIA			
Muteína No.	Sustitución de aminoácido	Aumento en peso molecular	Relación de título antivírico y valor de EIA
R27T	R27T	++	3
R27S	R27S	++	3

NITV	NITV	++	1,5
R27T+GNITV	R27T+GNITV	++++	4
R27S+GNITV	R27S+GNITV	++++	4
++: el peso molecular es 26 kDa que es una cadena de azúcar añadida a la misma.			
++++: el peso molecular es 30 kDa que es dos cadenas de azúcar añadidas a la misma.			

Ejemplo 4: Transfección y cultivo celular (células CHO)

Se cultivaron células CHO (DG44) en una placa de cultivo de células de 60 mm hasta que su confluencia alcanza aproximadamente el 40~80% ($1\sim 4 \times 10^5$ células/placa de 60 mm). Se mezclaron bien 3 μ l de reactivo Lipofectin™ (Gibco) con 97 μ l de α -MEM (sin suero y sin antibióticos), y se añadieron allí ADN del plásmido pcDNA3.1-IFN- β (0,1 μ g/ μ l o más, alrededor de 2 μ g) y pSP72-DHFR (0,2 μ g). Después de mantener la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió a las células CHO cultivadas anteriormente (figura 4). Un día después, el medio de cultivo se sustituyó con alfa-MEM suplementado con G418 50 μ g/ml y SBF al 10%. Posteriormente, las células se cultivaron en medio mínimo alfa-MEM que carecía de desoxirribonucleósido y ribonucleósido durante 7~10 días, para seleccionar células transfectantes. Después de ello, las células transfectantes CHO DHFR+ se seleccionaron secundariamente. Las células transfectantes CHO DHFR+ seleccionadas secundariamente se sometieron a colonización en una multiplaca de 96 pocillos mediante el método de la dilución limitante y se cultivaron de forma continua en un medio selectivo. Por último, las células transfectantes se cultivaron en medio mínimo que contenía suero al 10% con la concentración de MTX (metotrexato, Sigma) aumentando gradualmente en 2 veces desde 20 nM hasta 1000 nM, para seleccionar terciariamente clones resistentes de MTX cultivados en el medio selectivo con MTX.

Se separó una única célula de la línea celular sana cultivada en medio que contenía MTX 1 μ M durante al menos un mes. Primero, después de inocular una única célula en cada pocillo de una multiplaca de 96 pocillos y cultivarla, se seleccionó el pocillo que tenía una única célula. Se seleccionó un grupo candidato que mostraba un índice de expresión alto mediante análisis de cuantificación de EIA. El grupo candidato seleccionado se cultivó mediante transferencia en serie en una placa de 24 pocillos a una placa de 6 pocillos. El grupo candidato así cultivado se seleccionó de nuevo mediante análisis de cuantificación de EIA, para establecer finalmente una línea celular de alta expresión de interferón beta. Como resultado de medir la cantidad de interferón beta producido en la línea de células CHO recombinantes preparadas de esta manera anteriormente, mientras que la línea celular de interferón beta natural produjo 1,8 μ g/ml/24 horas de IFN- β , las líneas celulares CHO-R27T y CHO-R27T-GNITV que expresan muteínas de interferón beta produjeron 6,5 μ g/ml/24 horas y 7,0 μ g/ml/24 horas de IFN- β , respectivamente, que es 3 veces más que la de la línea celular natural.

Ejemplo 5: Purificación de interferón beta con una o más cadenas de azúcar añadidas producido en células CHO

La línea celular que incorpora una o más secuencias de muteína en el ejemplo 4 se cultivó usando una fábrica celular (Nunc, No. de catálogo 170069). Cada línea celular de expresión se diluyó con alfa-MEM que contenía SBF al 10% a una concentración de 5×10^4 células/ml, y se subcultivó en la fábrica celular con CO₂ al 5%, a 37°C durante 72 horas para confirmar el crecimiento celular. Las células se lavaron con PBS tres veces para eliminar el componente de suero residual al máximo, y el medio de cultivo se sustituyó con un medio sin suero (Sigma C8730). Después de la sustitución con el medio sin suero, la solución de cultivo se recogió cada 24 horas cuatro veces y se añadió al mismo medio sin suero fresco cada vez para la recogida. Las cuatro soluciones de cultivo recogidas totales se sometieron a purificación. Se rellenó una columna XK50/20 (Amersham-Pharmacia) con 200 ml de resina sepharosa blue (Amersham-Pharmacia) y se equilibró con 10 V.C. (volumen de columna) de un tampón A (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,4). La solución de cultivo microfiltrada se dejó fluir en la columna equilibrada a una velocidad de flujo de 20 ml/min, y se siguió por un detector de UV a una longitud de onda de 280 nm. Se dejó fluir un tampón B (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, etilenglicol al 30%, pH 7,4) en la columna para eliminar los componentes no absorbidos, y la proteína absorbida a la resina se eluyó con un tampón C (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, etilenglicol al 60%, pH 7,4). El efluente se sometió a diálisis con PBS (solución salina tamponada con fosfato), se concentró con un concentrador (Centricon, corte 10.000) y después se sometió a diálisis de nuevo contra PBS.

Ejemplo 6: Caracterización fisicoquímica de interferón beta con una o más cadenas de azúcar añadido producido en la línea celular CHO

Ejemplo 6-1: Análisis por SDS-PAGE e inmunotransferencia

La muestra purificada en el ejemplo 5 se mezcló con tampón de carga 5x (Tris-HCl 125 mM, SDS al 5%, glicerol al 50%, β -mercaptoetanol al 0,1%, azul de bromofenol 1 mg/ml) en una relación de 1:4, y la mezcla se pretrató a 95°C durante 5 minutos. Se cargaron 20 μ l de la muestra pretratada en un pocillo de un gel de poliacrilamida al 15% con un marcador de peso molecular estándar y se desarrolló. Después de completar la electroforesis, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie y se destiñó con solución de destinción. Como resultado, el interferón beta natural mostró una banda de alrededor de 18,0 kDa correspondiente a la proteína que no tiene cadena de azúcar y una

banda de alrededor de 22,0 kDa correspondiente a la proteína que tiene una cadena de azúcar. En el caso de IFN- β con una cadena de azúcar adicional introducida se detectó además una banda de alrededor de 26,0 kDa, y en el caso de IFN- β con dos cadenas de azúcar adicionales introducidas, se detectó además una banda de alrededor de 30,0 kDa, comparada con el patrón de bandas del interferón beta natural (figura 6).

Ejemplo 6-2: Prueba para confirmar la adición de ácido siálico al extremo terminal de la cadena de azúcar

Se midió el contenido de interferón beta en todas las proteínas purificadas usando un kit de ELISA de IFN- β humano (PBL). Se midió el contenido de ácido siálico en cada proteína mediante modificación del método de Masaki Ito et al., (Anal. Biochem. 300: 260, 2002). Se separó el ácido siálico de la glicoproteína haciendo reaccionar la proteína purificada con ácido clorhídrico 0,1 N a 80°C durante una hora. Parte de ello se marcó con fluoresceína mediante el uso de un kit de marcaje fluorescente de ácido siálico (Takara) y se sometió a HPLC para analizar el contenido. Los resultados se muestran en la tabla 3 como la relación en % de peso de ácido siálico en la muteína de interferón beta comparado con la del interferón beta natural.

Tabla 3

El peso de ácido siálico en la muteína de interferón beta	
Interferón beta	Peso de ácido siálico/peso de IFN- β
Natural	1,96 \pm 0,14
R27T, R27S	3,50 \pm 0,12
GNITV	3,23 \pm 0,32
R27T + GNITV, R27S + GNITV	6,90 \pm 0,25

Ejemplo 7: Actividad biológica de la muteína de interferón beta expresada en células CHO

Ejemplo 7-1: Actividades antivíricas de las muteínas de interferón beta R27T, R27S y GNITV

Las actividades antivíricas de las muteínas de interferón beta R27T, R27T+GNITV, GNITV y la del interferón beta del que se había eliminado la cadena de azúcar (IFN β -1b) se compararon relativamente entre sí basándose en la actividad antivírica del interferón beta natural (IFN β -1a). En este punto, se empleó Rebif (Serono) como el interferón beta natural.

Se cultivaron células A549 en MEM suplementado con SBF al 10%, solución de aminoácidos no esenciales MEM 100x y piruvato de sodio 100 mM. El día de tales análisis, las células se transfirieron al mismo medio fresco y la densidad celular se ajustó a 3×10^5 células/ml. Se diluyeron los interferones beta control y de prueba con el mismo medio. Tal dilución se llevó a cabo en una multiplaca de 96 pocillos que va contener en el pocillo un volumen de 100 μ l/pocillo y las muestras se diluyeron en serie de dos veces. Todas las muestras se prepararon en dos series. Se incluyeron pocillos control que contenían solo 100 μ l del medio (que no contenían interferón beta) en las mismas. Después de añadir 100 μ l de las células a cada pocillo, la placa se incubó a 37°C, CO₂ al 5% durante 20 horas. El medio se eliminó de la placa y se añadieron a cada pocillo 100 μ l de EMCV (1000 TCID₅₀/ml) diluido en el mismo medio. Después de incubar la placa a 37°C, CO₂ al 5% durante 22 horas, el medio se eliminó de la misma, y la placa se tiñó con violeta cristal. Después de eliminar el colorante, se añadieron en los mismos 100 μ l de 2-metoxietanol para extraer el colorante, y se midió la absorbancia a 450 nm para determinar la actividad antivírica.

Mientras que el interferón beta del que se había eliminado la cadena de azúcar (IFN β -1b) mostró actividad relativamente baja en las mismas condiciones, R27T, R27T+GNITV y GNITV mostraron actividades mayores que el interferón beta natural (IFN β -1a; Rebif). R27T+GNITV con dos cadenas adicionales de azúcar introducidas mostró actividad 4 veces mayor que el interferón beta natural, y R27T con una cadena adicional de azúcar introducida mostró actividad 3 veces mayor que el mismo (figura 7).

Ejemplo 7-2: Inhibición del crecimiento celular

Además, se examinaron los efectos de las muteínas de interferón beta sobre el crecimiento celular, y se compararon relativamente entre sí basándose en el efecto del interferón beta natural (IFN β -1a) igual que la actividad antivírica. En este punto, se empleó Rebif (Serono) como el interferón beta natural. La actividad antiproliferativa se midió usando células Daudi.

Las células Daudi se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml, glutamina 2 mM y SBF al 10%. Los interferones beta control y de prueba se diluyeron en serie en 2 veces con RPMI 1640 que contenía SBF al 10% en una multiplaca de 96 pocillos que va contener en el pocillo un volumen de 100 μ l/pocillo. Todas las muestras se prepararon en dos series. Las células se añadieron a una multiplaca de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 células/pocillo, y la placa se incubó a 37°C, CO₂ al 5% durante 40 a 48 horas. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 50 μ l del medio que contenía 1 μ Ci de ³[H]-timidina, y la placa se incubó durante 6 horas. Las células se recogieron y se midió la cantidad de radioactividad incorporada.

Las muteínas de interferón beta suprimieron el crecimiento de células Daudi y sus actividades eran dependientes de la dosis. El interferón beta del que se había eliminado la cadena de azúcar (IFN β -1b) mostró menor actividad antiproliferativa que el interferón beta natural (IFN β -1a), mientras que las muteínas de interferón beta R27T, R27T+GNITV y GNITV mostraron actividades mayores que el mismo. Las actividades de las muteínas de interferón beta se clasificaron en el orden de R27T+GNITV, R27T y GNITV (figura 8).

Ejemplo 7-3: Capacidad inmunorreguladora

Se midieron las capacidades inmunorreguladoras del interferón beta natural y muteínas del mismo a través de la activación de MHC de clase I en células A549.

Se cultivaron células A549 en DMEM suplementado con SBF al 10% y glutamina 2 mM. Las células se inocularon en el medio que contenía diluciones en serie de 2 veces del interferón beta natural, muteínas del mismo o interferón beta del que se había eliminado la cadena de azúcar (IFN β -1b) a una densidad de 1x10⁵ células/ml, respectivamente, y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 48 horas. Las células se trataron con una solución salina tamponada de Hank que contenía EDTA 5 mM y se recogieron por centrifugación. El precipitado separado de esta manera se resuspendió en un tampón de FACS a una densidad de 2x10⁷ células/ml, y se midió la cantidad de expresión de MHC de clase I mediante análisis de FACS. En esta medida se emplearon un anticuerpo anti-HLA ABC acoplado con biotina y estreptavidina acoplada con fluoresceína, y todas las muestras se hicieron en dos series.

Los efectos de aumento de impunidad de las muteínas de interferón beta eran similares a o ligeramente mayores que los del interferón beta natural (IFN β -1a). Tales efectos de las muteínas de interferón beta aumentaron en el orden GNITV, R27T y R27T+GNITV, que es igual a los dos actividades diferentes descritas anteriormente. El interferón beta que no tenía cadena adicional de azúcar mostró bajo efecto inmunorregulador comparado con su concentración (figura 9).

Ejemplo 7-4: Estudio de las constantes farmacocinéticas

Se realizó una prueba de actividad *in vivo* según el método que mide el cambio en la concentración en sangre de la muteína de interferón beta dependiente del tiempo en una rata a la que se ha administrado la muteína de interferón beta que se expresó en células CHO. Se emplearon ratas hembras Hsd: Sprague-Dawley que tenían un peso corporal medio de 246,3 ± 258,1 g en tal prueba de actividad *in vivo*, y se aclimataron durante una semana al ambiente de la jaula en la que se había ajustado la temperatura a 24 ± 1°C, humedad relativa al 55% y condiciones de iluminación a 12 horas luz/12 horas de oscuridad. Las ratas se criaron en la misma jaula durante el experimento.

Después de pesar las ratas y distribuir las al azar según sus pesos corporales medios, se dividieron en cuatro grupos de administración con interferón beta natural, dos muteínas y sin fármaco, respectivamente, cada uno consistía en 4 ratas. Se insertó un catéter en la vena yugular de las ratas mediante una operación quirúrgica 2 días antes del experimento. El peso corporal medio de las ratas con catéter insertado era de 253,5 g.

Se inyectaron en las ratas el interferón beta natural y cada muteína de interferón beta a través de la vena de la cola como una muestra de prueba. El catéter de la vena yugular se lavó con solución salina antes de la recogida de sangre, y se recogieron 0,3 ml de sangre en los tiempos correspondientes a 1, 5, 15, 30, 75, 180, 300 y 480 minutos después de la inyección. Después de la recogida de la sangre, el catéter se llenó con heparina en solución salina (50 UI/ml) para prevenir que se coagulara. Las muestras de sangre recogidas se trataron inmediatamente con una solución de citrato de sodio al 4% como anticoagulante para prevenir la coagulación, y se sometieron a centrifugación para separar el plasma excepto para hemocitos. El plasma separado se almacenó a -70°C. La concentración en sangre de interferón beta en el animal experimental se midió mediante una prueba antivírica. La figura 10 muestra las concentraciones en sangre de la muteína de interferón beta y el interferón beta natural que permanecen en las ratas según la evolución temporal. Además, se calcularon las constantes farmacocinéticas a partir de estas concentraciones residuales en sangre.

Los resultados se muestran en la tabla 4. Las muteínas de interferón beta R27T+GNITV y R27S+GNITV con dos cadenas adicionales de azúcar introducidas mostraron una semivida prolongada en tres veces más que la del interferón beta natural, y las muteínas de interferón beta R27T, R27S y GNITV con una cadena adicional de azúcar introducida mostraron una semivida prolongada en tres veces más que la del interferón beta natural.

[Tabla 4]

Semividas de muteínas de interferón beta e interferón beta natural en ratas					
Muestra	AUC (hr*UI/ml)	Tiempo medio de retención (h)	Vss (ml/kg)	Tasa de depuración (ml/kg/h)	Semivida (h)
R27T	203966	0,726214	65,0	100,1	2,48
GNITV	190610	0,647452	74,4	114,9	2,46
R27T+GNITV	316807	0,952376	45,1	60,5	3,50
Natural	116807	0,512376	96,1	187,5	1,13

Como se ha descrito anteriormente, según la presente invención, se pueden proporcionar muteínas de interferón beta que tienen actividad o capacidad mejorada o aumentada comparada con la del interferón beta natural.

5 Puesto que las muteínas de interferón beta humano de la presente invención contienen además una o dos cadenas adicionales de azúcar comparadas con el interferón beta humano natural, muestran actividad antivírica, actividad inhibidora de crecimiento celular, capacidad inmunorreguladora mejoradas o aumentadas y semivida prolongada. Esto significa que se puede reducir una dosis y el número de tiempos de inyección de interferón beta humano.

10 Mientras tanto, según la presente invención, también se proporcionan un gen que codifica la muteína de interferón beta, un vector de expresión en células animales que contiene el gen, una célula animal transfectada con el vector de expresión, un método para preparar la muteína de interferón beta humano mediante cultivo de la célula animal y una composición farmacéutica que comprende el interferón beta humano.

15

Lista de secuencias

<110> SHIN, Young Kee et al.

20 <120> Muteína de interferón beta humano

<130> EP51766HVpau

<140> EP 05 804 508.9

25 <141> 02-11-2005

<150> PCT/KR2005/003665

<151> 02-11-2005

30 <150> KR2004-88196

<151> 02-11-2004

<160> 11

35 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 369 088 T3

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

<210> 2
 <211> 166
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> característica mezcla
 10 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa en 27 es Thr o Ser

<400> 2
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Xaa Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

15

ES 2 369 088 T3

<210> 3
 <211> 498
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc 60
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatat tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc 120
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgatt gaccatctat 180
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat 240
gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaacca tctgaagaca 300
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat tttaccaggg gaaaactcat gagcagtctg 360
cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga gtacagtcac 420
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 480
acaggttacc tccgaaac 498

<210> 4
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador

15

<400> 4
gcaattgaat gggacgcttg aatactgcct c 31

<210> 5
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador

25

<400> 5
gaggcagtat tcaagcgtcc cattcaattg c 31

<210> 6
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Cebador

35

<400> 6
gcaattgaat gggagctcttg aatactgcct c 31

40

<210> 7
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador

50 <400> 7

gaggcagtat tcaagactcc cattcaattg c 31

5 <210> 8
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 8
cttacaggtt acctccgaaa cggtaatatc actgtctgaa gatctcctag cctgtcc 57

15 <210> 9
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 9
gaatgtccaa tggaggcttt gccattatag tgacagactt ctagaggatc ggacagg 57

25 <210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 10
ccggaattcg ccaccatgac caacaagtgt ctcctccaaa 40

35 <210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador

45 <400> 11
ccgctcgagg tcacttaaac agcatctgct ggttga 36

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una muteína de interferón beta humano que comprende una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina en el extremo C-terminal de un polipéptido que tiene actividad de interferón beta humano y que tiene una cadena de azúcar N-unida en la posición de la secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina.
- 10 2. La muteína de interferón beta humano de la reivindicación 1, en donde el polipéptido que tiene actividad de interferón beta humano es un interferón beta humano natural que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una parte esencial del mismo que tiene actividad de interferón beta humano.
- 15 3. La muteína de interferón beta humano de la reivindicación 1, en donde el polipéptido que tiene actividad de interferón beta humano tiene una sustitución de la arginina que corresponde a la arginina en la posición 27 de SEQ ID NO: 1 con serina o treonina y por tanto, contiene una cadena adicional de azúcar N-unida en esa posición de secuencia.
- 20 4. La muteína de interferón beta humano de la reivindicación 1, en donde el polipéptido que tiene actividad de interferón beta humano tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 que tiene la sustitución del aminoácido 27, arginina con treonina o serina, contiene las secuencias de aminoácidos del 25 al 28 que consiste en asparagina-glicina-treonina/serina-leucina por tal sustitución, y por tanto, contiene una cadena adicional de azúcar N-unida en esa posición de la secuencia asparagina-glicina-treonina/serina-leucina.
- 25 5. Una muteína de interferón beta humano que tiene una sustitución de la arginina que corresponde a la arginina en la posición 27 de SEQ ID NO: 1 con serina o treonina de un polipéptido que tiene actividad de interferón beta humano y por tanto, contiene una cadena de azúcar N-unida en esa posición de secuencia.
- 30 6. La muteína de interferón beta humano de la reivindicación 5, en donde el polipéptido que tiene actividad de interferón beta humano es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una parte esencial de la misma que tiene la actividad de interferón beta humano.
- 35 7. Un polinucleótido que codifica cualquiera de las muteínas de interferón beta humano de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. El polinucleótido de la reivindicación 7, en donde la muteína de interferón beta humano es una muteína de interferón beta humano que incluye una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 45 9. El polinucleótido de la reivindicación 7, en donde la muteína de interferón beta humano es una muteína de interferón beta humano que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 50 10. El polinucleótido de la reivindicación 7, en donde la muteína de interferón beta humano es una muteína de interferón beta humano que incluye una secuencia glicina-asparagina-isoleucina-treonina-valina en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 55 11. Un vector de expresión que expresa una muteína de interferón beta humano en una célula animal que comprende cualquiera de los polinucleótidos que codifican la muteína de interferón beta humano de las reivindicaciones 7 a 10.
- 60 12. Una célula animal transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 11.
13. Un método para preparar una muteína de interferón beta humano que comprende el paso de cultivar la célula animal de la reivindicación 12.
14. Una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las muteínas de interferón beta humano de las reivindicaciones 1 a 6.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, que muestra un efecto farmacológico de interferón beta humano natural.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 que tiene un efecto farmacológico de interferón beta humano natural, en donde dicho efecto farmacológico es prevenir o tratar enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en esclerosis múltiple, cáncer, trastornos autoinmunes, infecciones víricas, enfermedades relacionadas con VIH y hepatitis C.

Fig.1

1 atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc act aca gct ctt
M T N K C L L Q I A L L L C F S T T A L

1
61 tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag
S M S Y N L L G F L Q R S S N F Q C Q K

20
27
121 ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tat tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac
L L W Q L N G R L E Y C L K D R M N F D
↓
T/S

40
181 atc cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc
I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A L T I

60
241 tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tet agc act ggc tgg
Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W

80
301 aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc tat cat cag ala aac cat ctg aag
N E T I V E N L L A N V Y H Q I N H L K

100
361 aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttt acc agg gga aaa ctc atg agc agt
T V L E E K L E K E D F T R G K L M S S

120
421 ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt
L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K E Y S

140
481 cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac tit tac ttc att aac aga
H C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R

160
541 ctt aca ggt tac ctc cga aac tga aga tct cct agc ctg tcc ctc tgg gac tgg aca att
L T G Y L R N Stop

ggtaatatcactgtc
G N I T V

Fig.2

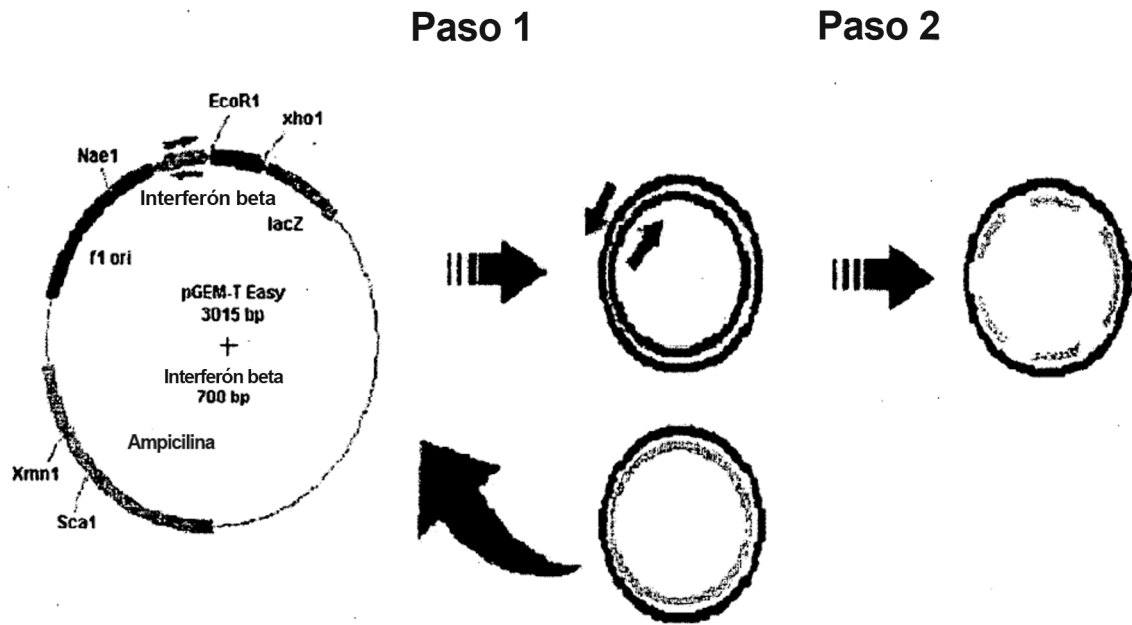


Fig.3

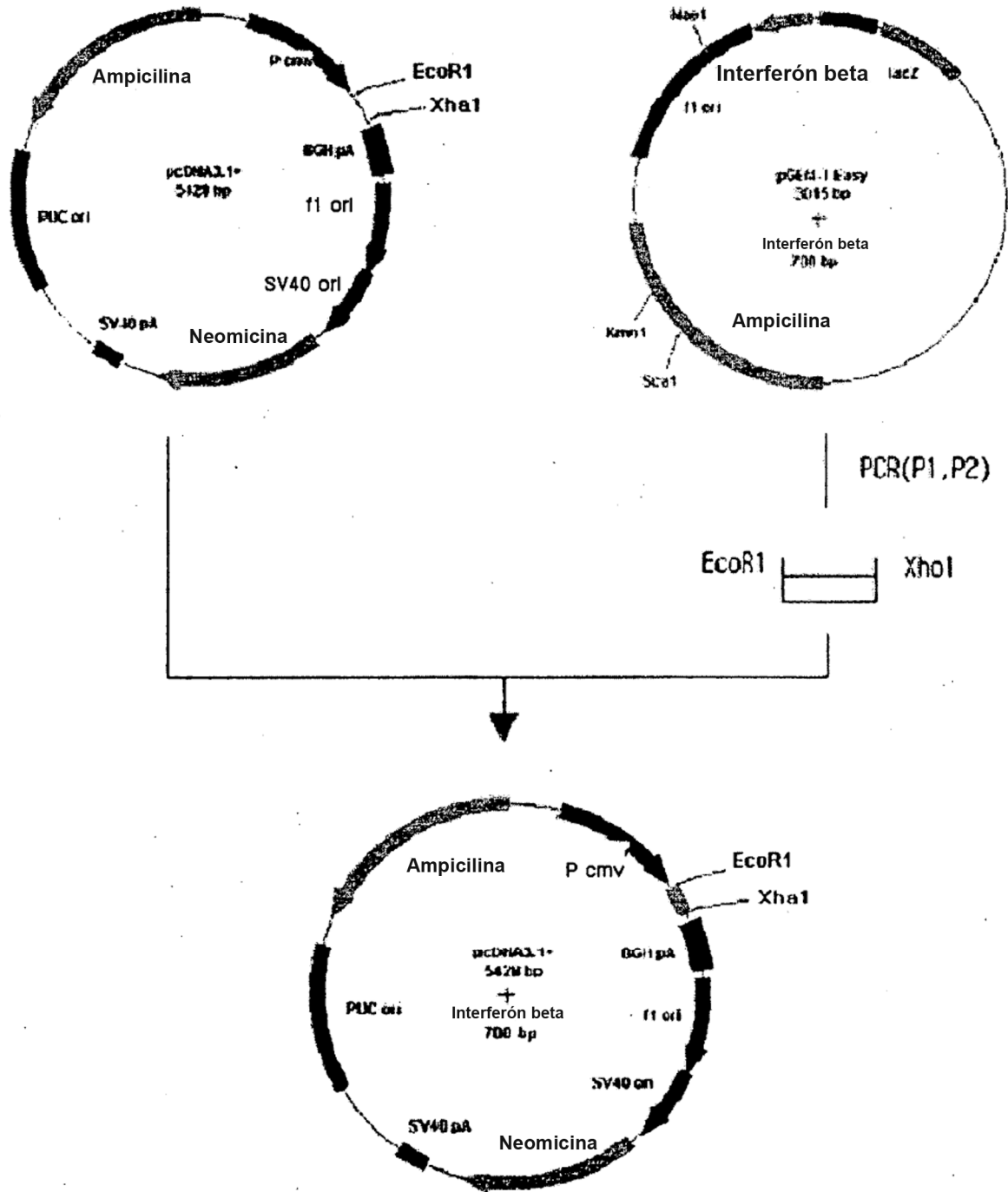
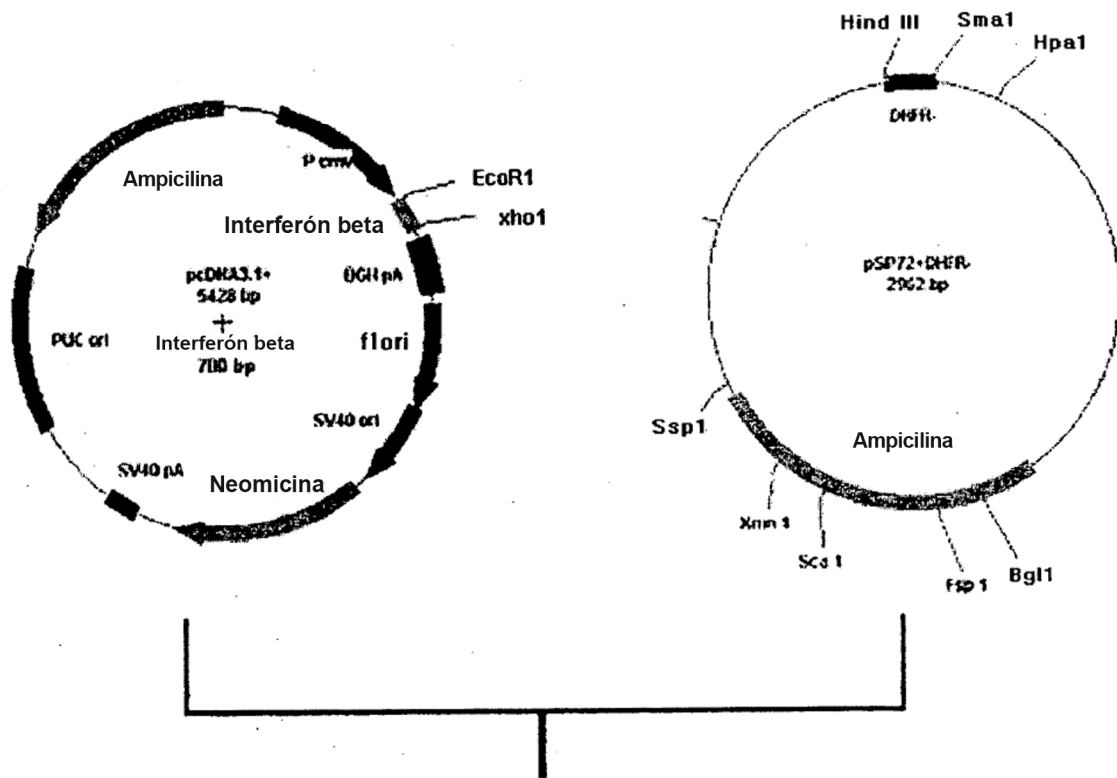


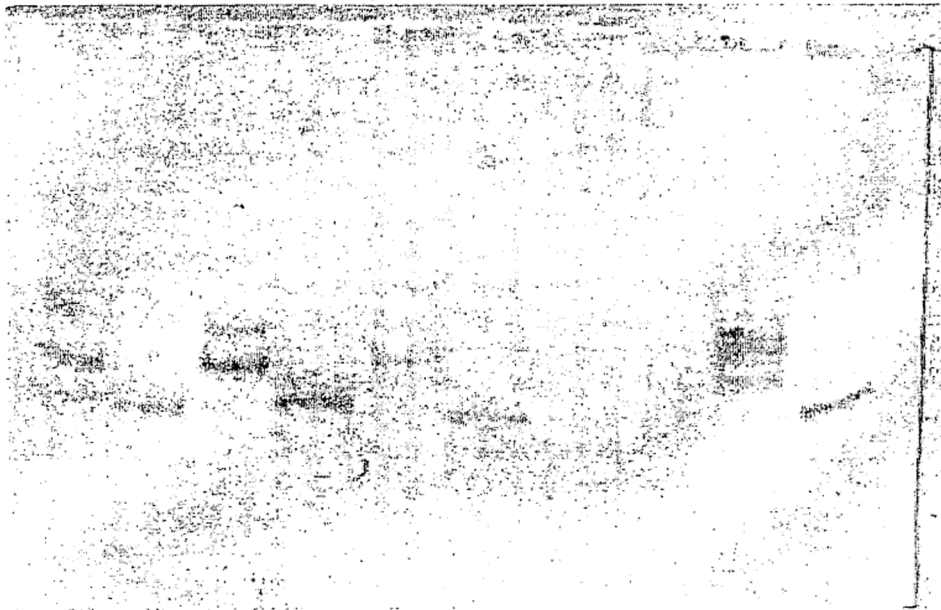
Fig.4



cotransfección

Fig.5

Natural		R27T		N1TV		Control		R27T+N1TV	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



1, 3, 5, 7, 9: - N-glicanasa

2, 4, 6, 8, 10: + N-glicanasa

Fig.6

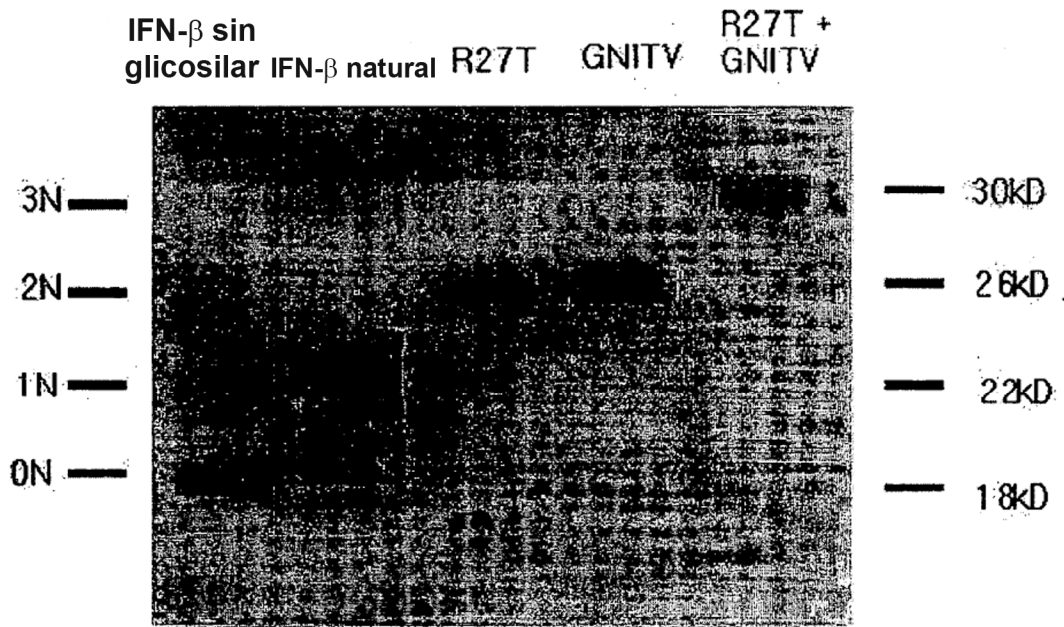


Fig.7

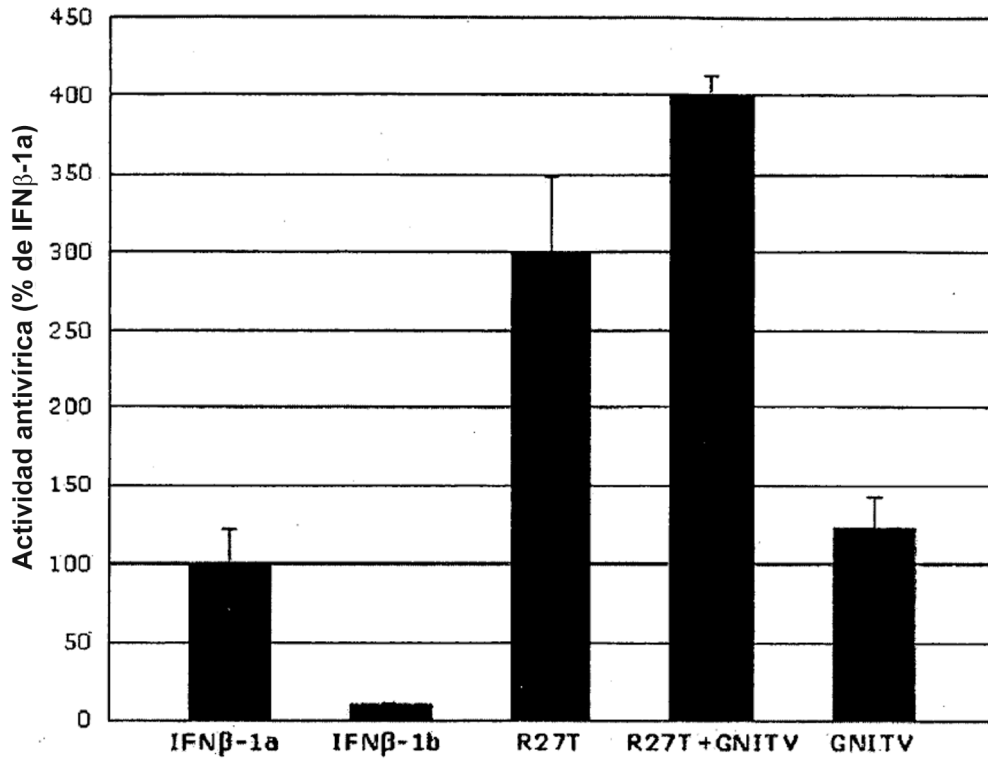


Fig.8

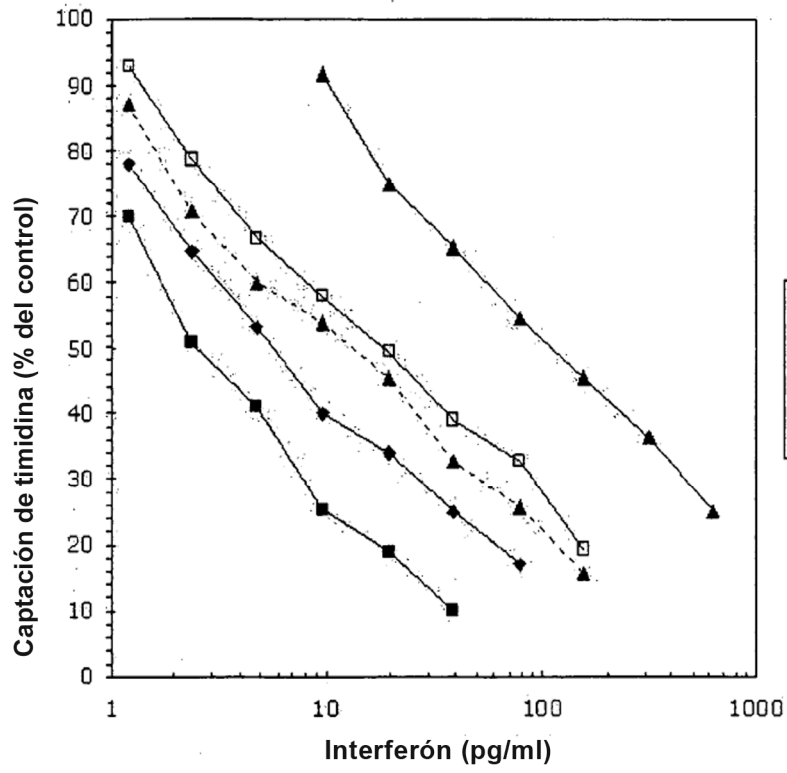


Fig.9

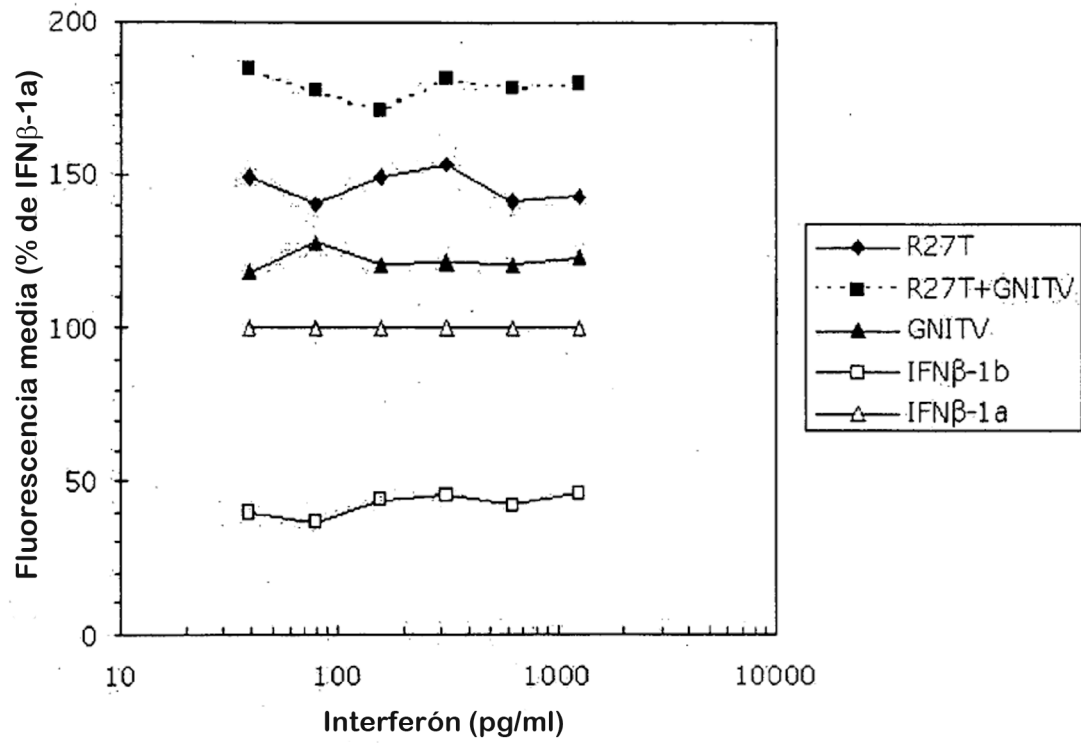


Fig.10

