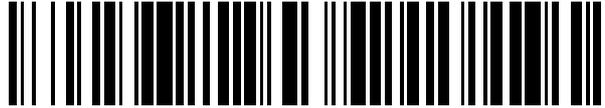


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 783**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04777620 .8**

96 Fecha de presentación: **06.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1646397**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2006**

54

Título: **Polipéptidos del interferón-beta-1b humano recombinante mejorados**

30

Prioridad:

11.07.2003 US 486657 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

28.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

28.12.2012

73

Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72

Inventor/es:

**NESTAAS, EIRIK y
PUNGOR, ERNO**

74

Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 393 783 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

Polipéptidos del interferón-β-1b humano recombinante mejorados

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/486.657 presentada el 11 de julio del 2003.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a polipéptidos del interferón-β-1b ("IFN-β-1b") humano recombinante, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos, con una actividad específica mejorada. La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos polipéptidos del IFN-β-1b, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos, útiles para tratar la esclerosis múltiple. La presente invención se refiere, además, a métodos para producir composiciones de IFN-β-1b de este tipo.

15

Antecedentes de la invención

20 El interferón-β ("IFN-β") humano recombinante se utiliza clínicamente para tratar determinados estados médicos, en particular la forma remitente-recurrente de la esclerosis múltiple ("MS" – siglas en inglés). IFN-β humano es un gen único que carece de intrones, y es un miembro de una gran familia de proteínas secretadas, conocidas como interferones ("IFNs"), que son citoquinas con actividades antivirales, anti-protozoales, inmunomoduladoras y reguladoras del crecimiento celular. Véase, por ejemplo, Pestka, S. (1986) *Meth. Enzymol.* 119:3-14; y Sen, G. C. y Lengyel P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:5017-5020.

25 Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos del IFN-β humano son conocidas tal como se muestra en Taniguchi, T. *et al.* (1980a) *Gene* 10:11-15 y la patente de EE.UU. nº 5.326.859. La tecnología de ADN recombinante hace posible producir un IFN-β que esté exento de virus, *p. ej.*, VIH-1, y otros contaminantes procedentes de fuentes humanas. Por medio de una tecnología de este tipo, se puede producir IFN-β humano cultivando una célula hospedante transformada con un vector de expresión que contiene un gen que codifica IFN-β.
30 La célula hospedante es una que puede transcribir el gen y produce la proteína deseada. Estas técnicas han sido utilizadas para producir IFN-β en células hospedantes bacterianas (Taniguchi, T. *et al.*, (1980b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5230-5233; Derynck, R. *et al.* (1980) *Nature* 287:193-197; y Goeddel, D.V. *et al.* (198) *Nucl. Acids Res.* 8:4057-4074), de mamíferos (Ohno, S. y Taniguchi, T. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:967-977; y McCormick, F. *et al.* (1984) *Mol. Cell Biol.* 4:166-172), y de insectos (Smith, G.E. *et al.* (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165).

35

Se han producido muteínas del IFN-β con características mejoradas, según se describe, por ejemplo, en Mark, D.F. *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5662-5666 y la patente de EE.UU. nº 4.588.585. Las muteínas son proteínas biológicamente activas, alteradas por mutación, o polipéptidos que se producen mediante técnicas de mutagénesis dirigida. IFN-β-1b es un muteína de IFN-β, en la que Cys17 está cambiado a Ser17 a través de una transición de T a A en la primera base del codón 17, lo cual evita una formación incorrecta de enlaces disulfuro. La producción y purificación de IFN-β-1b expresado en *E. coli* se describe, por ejemplo, en Lin, L.S. *et al.* (1986) *Meth. Enzymol.* 119:183-192 y la patente de EE.U. nº 5.814.485.

40

45 Se han aprobado dos formas diferentes de IFN-β y están disponibles para el tratamiento de la MS remitente-recurrente: (1) IFN-β-1a, que incluye Avonex[®] y Rebif[®]; y (2) IFN-β-1b, que incluye Betaseron[®] y Betaferon[®]. Estos productos de IFN-β comercializados disminuyen la tasa de recidiva, ralentizan el progreso de la enfermedad y mejoran las medidas inflamatorias de la actividad patológica. Véase, por ejemplo, Vartanian, T. (2003) *Clin. Ther.* 25:105-118.

50 IFN-β-1a difiere de IFN-β-1b en diversas maneras: (1) IFN-β-1a es una proteína glicosilada enlazada a N que es expresada en células de ovario de hámster chino ("CHO"), mientras que IFN-β-1b es una proteína no glicosilada que es expresada en *E. coli*; (2) IFN-β-1a tiene una longitud de 166 aminoácidos con Met1 en el extremo N, mientras que cuando IFN-β-1b es procesado en *E. coli* y se separa la metionina N-terminal, tiene una longitud de 165 aminoácidos con Ser2 en el extremo N; (3) al igual que IFN-β nativo, IFN-β-1a tiene un residuo cisteína en la posición 17, mientras que en IFN-β-1b, Cys17 está reemplazado por Ser17; y (4) IFN-β-1a tiene una actividad específica aproximadamente 10 veces mayor que IFN-β-1b. Véase, por ejemplo, Runkel, L. *et al.* (1998) *Pharm. Res.* 15:641-649; Weber, F. *et al.* (1999) *Neurology* 52 :1069-1071; y Francis, G. *et al.* (2000) *Neurology* 55:322-323.

55

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos con contenido en ácido siálico que se producen de manera ubicua en membranas del plasma de células de vertebrados y son particularmente abundantes en el sistema nervioso. Véase, por ejemplo, Lloyd, K.O. y Furukawa, K. (1998) *Glycocon. J.* 15:627-636. Los gangliósidos están implicados en el control del crecimiento y diferenciación celular, los cuales son mediados a través de un reconocimiento célula-célula o la interacción célula-matriz a través de proteínas similares a lectina, o mediante interacciones hidrato de carbono-hidrato de carbono. Los gangliósidos consisten en un resto lípido enlazado a una gran familia de estructuras de oligosacáridos que difieren en la posición de enlace glicosídico, la conformación del azúcar, el azúcar neutro y el contenido en ácido siálico. El perfil de gangliósidos del suero humano consisten en al menos diez compuestos diferentes que incluyen, en orden decreciente en abundancia, GM₃, GD₃, GD_{1a}, GM₂, GT_{1b}, MG-3, MG-4 y GD_{1b}, según se describe en Senn, H.J. *et al* (1989) *Eur. J. Biochem.* 181:657-662.

Los gangliósidos han demostrado bloquear la actividad específica de determinados IFNs humanos (a la que también se denomina en esta memoria "actividad inhibidora de gangliósidos") p. ej., actividad antiviral de IFN, bajo condiciones experimentales particulares. Por ejemplo, la actividad antiviral de IFN-β nativo derivado de fibroblastos, pero no IFN-α nativo derivado de leucocitos, es inhibida mediante pre-incubación con gangliósidos mixtos (Gupta, S.L. *et al.* (1984) *J. Interferon Res.* 4:305-314), y la actividad antiviral de IFN-β nativo es abolida por los gangliósidos GM₁, GM₂ GM₃, pero no por el ácido siálico (ácido N-acetilneuroamínico) solo (Fuse, A. *et al.* (1982) *Antiviral Res.* 2:161-166). Sin embargo, estos resultados se obtuvieron con interferones nativos sólo parcialmente purificados y no con IFN-β-1a o IFN-β-1b recombinante más altamente purificado.

Sumario de la invención

Se describen en esta memoria composiciones que comprenden un polipéptido del IFN-β-1b mejorado, o fragmento, análogo o variante del mismo, que tiene una actividad específica mayor que una composición de IFN-β de referencia, y métodos para producir composiciones de IFN-β-1b de este tipo. Ejemplos de composiciones de IFN-β de referencia incluyen, p. ej., una composición de IFN-β-1b de referencia o una composición de IFN-β-1a de referencia.

Se sabe que los gangliósidos inhiben la actividad específica del IFN-β (también denominada en esta memoria "actividad inhibidora de gangliósidos"). Así, en algunos aspectos, las composiciones de IFN-β-1b tienen una actividad inhibidora de gangliósidos disminuida. Por ejemplo, en esta memoria se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido del IFN-β-1b, o fragmento, análogo o variante del mismo, que tienen actividad inhibidora de gangliósidos disminuida y que tienen una actividad específica del IFN-β mayor en comparación con una composición de IFN-β de referencia. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas están esencialmente exentas de gangliósidos. Además, en algunos aspectos, la actividad específica del IFN-β de una composición farmacéutica de la presente invención es al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces mayor que una composición de IFN-β de referencia.

La presente invención proporciona un procedimiento que comprende disminuir la actividad inhibidora de gangliósidos de una composición que comprende una composición de IFN-β-1b para obtener una composición que tenga una actividad inhibidora de gangliósidos disminuida y que tenga una actividad específica de IFN-β mayor que una composición de IFN-β de referencia, en donde dicha disminución de dicha actividad inhibidora de gangliósidos se realiza mediante oxidación selectiva de dicho polipéptido del IFN-β-1b. En un aspecto, el procedimiento comprende una etapa de separar gangliósidos a partir de la composición, de modo que la composición está esencialmente exenta de gangliósidos. En un aspecto adicional, la actividad inhibidora de gangliósidos es disminuida oxidando de manera selectiva la composición, p. ej., mediante calor, oxidación química o enzimática. En un aspecto, la oxidación es mediante un agente oxidante. En aspectos preferidos, el agente oxidante se selecciona de un grupo que consiste en peryodato de sodio, ácido *o*-yodosobenzoico, CuCl₂ y *o*-fenantrolina. En un aspecto preferido, el agente oxidante es peryodato de sodio. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un IFN-β-1b obtenido de un procedimiento de este tipo, en que las composiciones farmacéuticas tienen una actividad inhibidora de gangliósidos disminuida y tienen una actividad específica de IFN-β que es mayor que una composición de IFN-β de referencia. En un aspecto, la composición farmacéutica obtenida de un procedimiento de este tipo está esencialmente exenta de gangliósidos.

También se describen en esta memoria polipéptidos del IFN-β-1b mejorados, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos, que son selectivamente oxidados y que tienen una actividad específica mayor en comparación con una composición de IFN-β de referencia. Se describen, además, composiciones farmacéuticas

- que comprenden polipéptidos del IFN- β -1b mejorados de este tipo, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos. En algunos aspectos, la actividad específica de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado, o fragmento, análogo, derivado o variante del mismo de la presente invención es al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces mayor que una composición de IFN- β de referencia. En algunos aspectos, la oxidación selectiva es mediante calor, oxidación química o enzimática. En un aspecto, la oxidación es mediante un agente oxidante. En aspectos preferidos, el agente oxidante se selecciona de un grupo que consiste en peryodato de sodio, ácido *o*-yodosobenzoico, CuCl₂ y *o*-fenantrolina. En un aspecto preferido, el agente oxidante es peryodato de sodio.
- La presente invención proporciona también un procedimiento que comprende oxidar selectivamente un polipéptido del IFN- β -1b para obtener un polipéptido del IFN- β -1b mejorado, en el que el polipéptido del IFN- β -1b mejorado tiene una actividad específica mayor que una composición de IFN- β de referencia. En algunos aspectos, la oxidación selectiva es mediante calor, oxidación química o enzimática. En un aspecto, la oxidación es mediante un agente oxidante. En aspectos preferidos, el agente oxidante se selecciona de un grupo que consiste en peryodato de sodio, ácido *o*-yodosobenzoico, CuCl₂ y *o*-fenantrolina. En un aspecto preferido, el agente oxidante es peryodato de sodio. La presente invención proporciona también polipéptidos del IFN- β -1b mejorados y composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos del IFN- β -1b mejorados, obtenidos mediante un procedimiento de este tipo.
- Se describen en esta memoria ensayos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados y composiciones farmacéuticas.
- Se describen, además, composiciones que comprenden un soporte farmacéuticamente aceptable y un polipéptido o composición farmacéutica de IFN- β -1b mejorado.
- Se proporcionan métodos para utilizar las composiciones de IFN- β -1b. Las composiciones de IFN- β -1b son útiles para tratar la esclerosis múltiple, p. ej. la esclerosis múltiple ("MS") remitente-recurrente, así como otras formas de MS, incluida MS progresiva secundaria, MS progresiva primaria y MS recurrente progresiva.
- Breve descripción de las figuras
- Figura 1. Secuencias de aminoácidos de IFN- β -1a (SEQ ID NO: 1) e IFN- β -1b (SEQ ID NO: 2). Las secuencias de polinucleótidos, secuencias de aminoácidos y la estructura del IFN- β -1a se describen, por ejemplo, en Innis, M.A. y McCormick, F. (1986) *Meth. Enzymol.* 119:397-403 y la patente de EE.UU. n° 4.966.843. Las secuencias de polinucleótidos, secuencias de aminoácidos y la estructura del IFN- β -1b se describen, por ejemplo, en Mark, D.F. *et al.* (1984) *supra* y la patente de EE.UU. n° 4.588.585. Cuando IFN- β -1b se procesa en *E. coli* y se separa la metionina N-terminal, tiene una longitud de 165 aminoácidos, con Ser2 en el extremo N.
- Figura 2. Efecto de Met1 N-terminal, reemplazo de Cys17 por Ser17, glicosilación enlazada a N y SDS sobre la actividad biológica de IFN- β -1a *in vitro*. (A) IFN- β -1a e IFN- β -1a_{SER17}, en que Cys17 está reemplazado por Ser17, se expresaron en células CHO, se purificaron mediante cromatografía de afinidad y se sometieron a ensayo en el ensayo de inducción del gen MxA, según se describe en el Ejemplo 1. (B) IFN- β -1a_{SER17} reducido y no reducido se desglicosilaron con péptido N-glicosidasa F ("PNGasa F") y se sometieron a ensayo en el ensayo de inducción del gen MxA.
- Figura 3. Efecto de gangliósidos sobre la actividad biológica de IFN- β -1b *in vitro*. IFN- β -1b se expuso a diversas concentraciones de los gangliósidos indicados, y luego se sometió a ensayo en el ensayo de inducción del gen MxA *in vitro*, según se describe en el Ejemplo 2. Se indican las vías que conducen a la generación de los diversos gangliósidos partiendo de GM₃.
- Figura 4. Presencia de hidratos de carbono en preparados de IFN- β -1b. Dos lotes de IFN- β -1b se analizaron en cuanto al contenido en monosacáridos (A) antes y (B) después de purificación adicional. (A) Los lotes A y B de IFN- β -1b se sometieron a hidrólisis ácida en HCl 6 M o TFA 2 M y se analizaron en cuanto a la presencia de seis monosacáridos, según se describe en el Ejemplo 3. (B) El lote A de IFN- β -1b se purificó ulteriormente mediante RP-HPLC, NAP 10, cromatografía en columna de Sephadex G-25 o de Con A Sepharose según se indica, y luego se analizaron en cuanto a la presencia de seis monosacáridos.

Descripción detallada de la invención

Las composiciones farmacéuticas, preparadas mediante un procedimiento de la presente invención, comprenden un polipéptido del IFN- β -1b, fragmento, análogo, derivado o variante del mismo, y tienen una actividad específica del IFN- β -1b mejorada. Los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos están constituidos por polipéptidos del IFN- β -1b que tienen una actividad específica mayor en comparación con una composición de IFN- β de referencia. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas que comprenden un IFN- β -1b tienen una actividad inhibidora de gangliósidos disminuida y una mayor actividad específica de IFN- β . En un aspecto, las composiciones farmacéuticas están esencialmente exentas de gangliósidos que inhiben la actividad específica de IFN- β , y tienen una actividad específica de IFN- β mejorada. Se proporcionan métodos para obtener las composiciones de IFN- β -1b mejoradas. En una realización preferida, las composiciones de IFN- β -1b mejoradas se obtienen oxidando selectivamente el polipéptido del IFN- β -1b.

La presente invención proporciona procedimientos para obtener composiciones de IFN- β -1b con actividad específica mejorada. Los procedimientos de la presente invención son útiles para disminuir o inactivar la actividad inhibidora de gangliósidos y/o para separar (o reducir la cantidad de) gangliósidos que pueden inhibir la actividad específica de IFN- β y, por consiguiente, las composiciones de IFN- β -1b de la presente invención tienen una actividad específica de IFN- β mejorada.

Definiciones

Al describir la presente invención, los siguientes términos y expresiones se definen como se indica más abajo.

“Proteínas o polipéptidos recombinantes” se refieren a proteínas o polipéptidos producidos mediante técnicas de ADN recombinante, *es decir*, producidos a partir de células, microbianas o de mamíferos, transformadas mediante una construcción de expresión de ADN recombinante exógena que codifica la proteína o polipéptido deseado. Proteínas o polipéptidos expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos estarán típicamente exentos de glicano. Proteínas o polipéptidos expresados en levaduras pueden tener un modelo de glicosilación diferente del que se expresa en células de mamíferos.

Proteínas o polipéptidos “nativos” o “que se producen de forma natural” se refieren a proteínas o polipéptidos recuperados a partir de una fuente que se produce en la naturaleza. La expresión “IFN- β nativo” o “IFN- β que se produce de forma natural” incluiría IFN- β nativo o que se produce de forma natural y fragmentos del mismo, e incluiría modificaciones post-traducción de IFN- β y fragmentos del mismo, incluidas, pero no limitadas a acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, acilación y escisión.

Una “secuencia codificadora” de ADN o polinucleótidos es una secuencia de ADN o polinucleótidos que se transcribe en ARNm y se traduce en un polipéptido en una célula hospedante o se dispone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora son el codón de inicio en el extremo N 5' y el codón de terminación de la traducción en el extremo C 3'. Una secuencia codificadora puede incluir secuencias procarióticas, ADNc procedente de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico procedentes de ADN eucariótico y secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción estará habitualmente situada en posición 3' con respecto a la secuencia codificadora.

“Secuencia de ADN o polinucleótido” es un heteropolímero de desoxirribonucleótidos (bases adenina, guanina, timina, citosina). Secuencias de ADN o polinucleótidos que codifican las proteínas o polipéptidos se pueden ensamblar a partir de fragmentos de ADN derivados de ADNc sintético y enlazadores de oligonucleótidos cortos para proporcionar un gen sintético que sea capaz de ser expresado en un vector de expresión de ADN recombinante. Al discutir la estructura de moléculas de ADN de doble cadena particulares, las secuencias se pueden describir en esta memoria de acuerdo con la convención normal de proporcionar solamente la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADNc.

“Vector o plásmido de expresión recombinante” es una construcción de vector o plásmido de ADN replicable utilizada para amplificar o expresar ADN que codifica las proteínas o polipéptidos. Un vector o plásmido de expresión contiene secuencias control de ADN y una secuencia codificadora. Las secuencias control de ADN incluyen secuencias de promotor, sitios de unión a ribosomas, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores situados aguas arriba, y potenciadores. Sistemas de expresión recombinantes, según se definen en esta memoria, expresarán las proteínas o polipéptidos tras la

inducción de los elementos reguladores.

“Células hospedantes transformadas” se refieren a células que han sido transformadas y transfectadas con ADN exógeno. El ADN exógeno puede o puede no estar integrado (*es decir*, enlazado de forma covalente) a ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula hospedante. En procariotas y levaduras por ejemplo, el ADN exógeno puede mantenerse sobre un elemento episomal tal como un plásmido o integrarse establemente en ADN cromosómico. Con respecto a células eucarióticas, una célula transformada de modo estable es una en la que el ADN exógeno ha sido integrado en el cromosoma. Esta estabilidad viene demostrada por la capacidad de las líneas o clones de células eucarióticas de producir, a través de replicación, una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

“IFN o IFNs” se refiere a la familia de proteínas secretadas conocidas como interferones, que son citoquinas con actividades antivirales, anti-protozoales, inmunomoduladoras y reguladoras del crecimiento de células. Los IFNs se clasificaron originalmente por sus fuentes: leucocitos (IFN- α -1 e IFN- α -2), fibroblastos (IFN- β) y células inmunes (IFN- γ). Véase, por ejemplo, Peskta, S. (1986) *supra*; Sen, G.C. y Lengyel, P. (1992) *supra*; y Pestka, S., comp., *Interferons Part C in Meth. Enzymol.* Vol. 119, Academic Press, Inc., Nueva York, NY. (1986).

“IFN- β ” se refiere a IFN de fibroblastos, que en el hombre es un gen único que carece de intrones. La secuencia de ADN o polinucleótidos de IFN- β humano se describe en Taniguchi, T. *et al.* (1980a) *supra* y la patente de EE.UU. n° 5.326.859. El ADNc de IFN- β humano codifica un pro-polipéptido de 187 aminoácidos de longitud. Una secuencia señal de 21 aminoácidos se escinde para formar el polipéptido del IFN- β secretado maduro que tiene una longitud de 166 aminoácidos.

“IFN- β -1a” se refiere a IFN- β humano recombinante expresado en células de ovario de hámster chino (“CHO”). Tal como se muestra en la Figura 1, IFN- β -1a secretado tiene una longitud de 166 aminoácidos, correspondiente a IFN- β nativo. IFN- β -1a está glicosilado y enlazado a N en el residuo asparagina en la posición 80 (Asp80). Véase, por ejemplo, Innis, M.A. y McCormick F. *et al.* (1986) *supra* y la patente de EE.UU. n° 4.966.843.

“IFN- β -1b” se refiere a IFN- β humano recombinante expresado en células hospedantes de *E. coli* y que tiene una sustitución del aminoácido cisteína por serina en la posición 17 (Ser17). Cuando IFN- β -1b se procesa en *E. coli* y se separa la metionina N-terminal, tiene una longitud de 165 aminoácidos, con Ser2 en el extremo N. IFN- β -1b no está glicosilado. Véase, por ejemplo, Mark, D.F. *et al.* (1984) *supra* y la patente de EE.UU. n° 4.588.585.

Composiciones de “IFN- β -1b mejorado” son composiciones de IFN- β -1b (p. ej. polipéptidos del IFN- β -1b, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos, y composición farmacéutica que comprende polipéptidos del IFN- β -1b, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos) que tienen una mayor actividad específica en comparación con una composición de IFN- β de referencia. En una realización preferida, las composiciones de IFN- β -1b mejoradas, preparadas mediante un procedimiento de la presente invención, se obtienen oxidando selectivamente la composición de IFN- β -1b utilizando calor, oxidación química o enzimática. En otra realización preferida, las composiciones de IFN- β -1b mejoradas se obtienen oxidando selectivamente la composición de IFN- β -1b utilizando un agente oxidante. En otra realización preferida, una composición de IFN- β -1b, preparada mediante un procedimiento de la presente invención, se obtiene disminuyendo la magnitud de la actividad inhibidora de gangliósidos en la composición. En otra realización preferida, una composición de IFN- β -1b, preparada mediante un procedimiento de la presente invención, se obtiene separando gangliósidos de la composición, de modo que la composición esté esencialmente exenta de gangliósidos.

Un “polipéptido del IFN- β -1b oxidado selectivamente, o fragmento, análogo o variante del mismo” es una composición de IFN- β mejorada, en donde un polipéptido del IFN- β -1b, o fragmento, análogo o variante del mismo se oxida selectivamente según se describe en esta memoria para obtener un polipéptido del IFN- β -1b mejorado (o composición de IFN- β -1b mejorada) que tiene una actividad específica mayor que una composición de IFN- β de referencia.

“Sustancialmente exentas de gangliósidos”, con referencia a las composiciones de IFN- β -1b preparadas mediante un procedimiento de la presente invención, significa que los gangliósidos en la composición de IFN- β -1b no son detectables por los métodos descritos en esta memoria o métodos de detección conocidos, o que la actividad inhibidora de los gangliósidos está disminuida en la composición en comparación con una composición de IFN- β de referencia. En realizaciones preferidas, las composiciones de IFN- β -1b preparadas mediante un procedimiento de la presente invención se obtienen utilizando los procedimientos descritos en esta memoria para separar (o

disminuir la cantidad de) gangliósidos y/o para disminuir o inactivar la actividad inhibidora de gangliósidos en las composiciones de IFN- β -1b. Con ello, se obtienen composiciones de IFN- β -1b que están esencialmente exentas de gangliósidos y/o que tienen una actividad inhibidora de gangliósidos disminuida o inactivada.

5 Los términos “análogos”, “fragmentos”, “derivados” y “variantes”, cuando se alude a los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados, significan análogos, fragmentos, derivados y variantes de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados de este tipo que conservan una actividad funcional esencialmente similar o esencialmente la misma función o actividad biológica que los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados según se describe en esta memoria.

10 Un “análogo” incluye un pro-polipéptido que incluye dentro del mismo la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado. El polipéptido del IFN- β -1b mejorado puede escindir-se de los aminoácidos adicionales que completan la molécula de pro-IFN- β -1b mediante procedimientos naturales, *in vivo*, o mediante procesos bien conocidos en la técnica tales como por escisión enzimática o química. Por ejemplo, IFN- β -1b (véase la Figura 1) se expresa en *E. coli* como un pro-IFN- β -1b de 166 aminoácidos que es procesado *in vivo* para liberar el IFN- β -1b maduro activo de 165 aminoácidos.

15 Un “fragmento” es una porción de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado que conserva una actividad funcional sustancialmente similar o esencialmente la misma función o actividad biológica que un polipéptido del IFN- β -1b mejorado, tal como se muestra en los ensayos *in vitro* descritos en esta memoria, según se describe adicionalmente más abajo.

20 Un “derivado” incluye todas las modificaciones de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado de esta invención que conserva esencialmente las funciones descritas en esta memoria e incluye una estructura y función concomitante adicionales, *p. ej.* polipéptidos PEGilados, que tienen una mayor semivida.

25 Una “variante” incluye polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos lo suficientemente similar con la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados originales. La expresión “suficientemente similar” significa una primera secuencia de aminoácidos que contiene un número suficiente o mínimo de residuos aminoácidos idénticos o equivalentes con relación a una segunda secuencia de aminoácidos, de modo que la primera y segunda secuencias de aminoácidos tienen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que es al menos aproximadamente 45%, de preferencia aproximadamente 75% a 98% idéntico, se definen en esta memoria como suficientemente similares. Preferiblemente, variantes serán suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados preferidos. Variantes incluyen variantes de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados codificados por un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido, o a un complemento del mismo, bajo condiciones estrictas. Variantes de este tipo conservarán generalmente la actividad funcional de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados. Variantes incluyen polipéptidos del IFN- β -1b mejorados que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Variantes que tienen una actividad antiviral pueden identificarse mediante el rastreo de genotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes de truncación o puntuales, de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados, utilizando el ensayo de inducción del gen MxA que se describe bajo Ensayo para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN- β -1b.

30 “Actividad funcional sustancialmente similar” y “sustancialmente la misma función o actividad biológica” significa en cada caso que el grado de actividad biológica se encuentra dentro de aproximadamente 50% a 100% o más, preferiblemente dentro de 80% a 100% o más y, más preferiblemente, dentro de aproximadamente 90% a 100% o más de la actividad biológica demostrada por el polipéptido con el que está siendo comparado cuando la actividad biológica de cada uno de los polipéptidos se determina por el mismo proceso o ensayo. Por ejemplo, un polipéptido que tenga una actividad funcional sustancialmente similar a IFN- β -1b es uno que, después de la oxidación en los ensayos descritos en el Ejemplo 4, demuestra la capacidad de inducir al gen MxA o de inhibir la producción de virus *in vitro* según se describe bajo Ensayos para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN- β -1b.

35 La “similitud” entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Un aminoácido de un polipéptido es similar al correspondiente aminoácido de un segundo polipéptido si es idéntico o una sustitución de aminoácidos conservativa. Sustituciones conservativas incluyen las descritas en Dayhoff, M.O., comp., *The Atlas of Protein Sequence and Structure 5*, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978), y en Argos, P. (1989) *EMBO J.* 8:779-785. Por ejemplo, aminoácidos pertenecientes a uno de los siguientes grupos representan cambios o sustituciones

conservativos:

-Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr;

-Cys, Ser, Tyr, Thr;

-Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;

5 -Lys, Arg, His;

-Phe, Tyr, Trp, His; y

-Asp, Glu.

10 “Mamífero” incluye seres humanos y animales domésticos tales como gatos, perros, cerdos, ganado vacuno, ovejas, cabras, caballos, conejos y similares.

15 “Actividad específica” o “actividad específica de IFN- β ” tal como se utiliza en esta memoria con referencia a una composición de IFN- β -1b preparada mediante un procedimiento de la presente invención, significa una actividad o función biológica de un IFN- β , p. ej. IFN- β -1b o IFN- β -1a. Las actividades o funciones biológicas de IFN- β -1b e IFN- β -1a son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, p. ej., la actividad antiviral. Una actividad específica de este tipo se puede detectar y medir utilizando los métodos descritos en esta memoria o utilizando cualquier método conocido en la técnica (véanse, p. ej., los ensayos descritos en Fellous et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:3082-3086; Czerniecki et al. (1984) J. Virol. 49(2):490-496; Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5662-5666; Branca et al. (1981) Nature 277:221-223; Williams et al. (1979) Nature 282:582-586; Herberman et al. (1979) Nature 277:221-223; Anderson et al. (1982) J. Biol. Chem. 257(19):11301-11304).

25 En una realización preferida, la composición de IFN- β -1b preparada mediante un procedimiento de la presente invención tiene una actividad específica según se detecta y mide utilizando el ensayo de inducción del gen MxA o el ensayo de producción viral, según se describe en esta memoria bajo Ensayos para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN- β -1b. La actividad antiviral se determina con relación a la actividad de un IFN- β humano de referencia, p. ej. IFN- β -1b o IFN- β -1a de referencia (véase, p. ej. Pestka, S. (1986) *Meth. Enzymol.* 199:14-23). En una realización, la actividad específica del IFN- β -1b utilizado en esta memoria es $\sim 3 \times 10^7$ UI/mg, según se determina utilizando el ensayo del efecto citopático antiviral (“CPE” – siglas en inglés) con células A549 y virus de la encefalomiелitis murina (“EMC” – siglas en inglés).

35 “Composición de IFN- β -1b” se refiere a un polipéptido del IFN- β -1b, fragmento, análogo, derivado o variante del mismo, o composición (p. ej. una composición farmacéutica) que comprende un polipéptido del IFN- β -1b, fragmento, análogo, derivado o variante del mismo.

40 “Actividad específica mejorada”, tal como se utiliza en esta memoria, significa que la actividad específica de la composición de IFN- β -1b preparada mediante un procedimiento de la presente invención es mayor que la de una composición de IFN- β de referencia. Composiciones de IFN- β de referencia adecuadas incluyen, p. ej., composiciones de IFN- β -1b de referencia o composiciones de IFN- β -1a de referencia. Por ejemplo, en una realización, la composición de IFN- β -1b preparada mediante un procedimiento de la presente invención tiene una actividad específica, según se mide en el ensayo de inducción del gen MxA o el ensayo de producción viral, según se describe en esta memoria bajo Ensayos para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN- β -1b, que es mayor que la actividad específica de una composición de IFN- β -1b de referencia. Una actividad específica mejorada de una composición de IFN- β -1b preparada mediante un procedimiento de la presente invención es preferiblemente al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 6 veces, al menos 8 veces o al menos 10 veces mayor que la actividad específica de una composición de IFN- β de referencia (p. ej., una composición de IFN- β -1b de referencia o una composición de IFN- β -1a de referencia).

50 Los gangliósidos pueden inhibir la actividad específica de IFN- β (denominada también en esta memoria “actividad inhibidora de gangliósidos”). La presente invención proporciona procedimientos para disminuir la actividad inhibidora de gangliósidos o separar gangliósidos de las composiciones de IFN- β -1b y, por consiguiente, aumentar la actividad específica de IFN- β . Los gangliósidos se pueden separar o reducir en una composición utilizando los métodos descritos en esta memoria o conocidos en la técnica. De manera similar, la actividad inhibidora de gangliósidos se puede reducir o disminuir según se describe en esta memoria o utilizando métodos conocidos en la técnica, p. ej. para separar, reducir o inactivar gangliósidos.

55 “Composición de IFN- β de referencia” se refiere a una composición que comprende un IFN- β (p. ej., IFN- β -1b o IFN- β -1a) que no está tratado o manipulado según se describe en esta memoria para mejorar una actividad

específica de IFN- β de la misma y/o según se describe en esta memoria para obtener una composición de IFN- β -1b de la presente invención. La composición de IFN- β de referencia puede utilizarse como un patrón para comparar y determinar la actividad específica relativa de la composición de IFN- β de referencia con la actividad específica de una composición de IFN- β -1b de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, el IFN- β de la composición de referencia no se oxida selectivamente, mientras que el polipéptido del IFN- β -1b mejorado se obtiene mediante oxidación selectiva del polipéptido del IFN- β -1b y, con ello, resulta en una composición de IFN- β -1b que tiene una mayor actividad específica en comparación con la composición de IFN- β de referencia.

También, por ejemplo en otra realización, el IFN- β de la composición de referencia no está tratado para separar (o reducir la cantidad de) gangliósidos, mientras que la composición de IFN- β -1b de la presente invención está tratada para separar (o para reducir la cantidad de) gangliósidos que resulta en una composición de IFN- β -1b que está sustancialmente exenta de gangliósidos en comparación con la composición de IFN- β de referencia. También, por ejemplo en otra realización, el IFN- β de la composición de referencia no está tratado para reducir o inactivar la actividad inhibidora de gangliósidos, mientras que la composición de IFN- β -1b de la presente invención está tratada para disminuir o inactivar la actividad inhibidora de gangliósidos que resulta en una composición de IFN- β -1b que tiene una actividad específica incrementada en comparación con la composición de IFN- β de referencia.

En esta memoria se describen métodos de la presente invención para separar (o reducir la cantidad de) gangliósidos, o para disminuir o inactivar la actividad inhibidora de gangliósidos, e incluyen pero no se limitan a, p. ej., la oxidación selectiva del polipéptido del IFN- β -1b. Métodos de la presente invención para oxidar selectivamente polipéptidos del IFN- β -1b incluyen, pero no se limitan a, p. ej., utilizar calor, oxidación química o enzimática.

La actividad específica de una composición de IFN- β -1b de la presente invención se puede someter a ensayo en comparación con la actividad específica de la composición de IFN- β de referencia utilizando un método para detectar y/o medir una actividad específica de IFN- β , p. ej. según se describe en esta memoria o según se conoce en la técnica.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado de la invención que, cuando se administra a un ser humano que lo necesite, es suficiente para efectuar el tratamiento, según se define más abajo, para la esclerosis múltiple (“MS”) recurrente-remitente, así como otras formas de MS, que incluyen MS progresiva secundaria, MS progresiva primaria y MS recurrente progresiva. La cantidad de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado de la invención que constituye una “cantidad terapéuticamente eficaz” variará en función de la proteína de IFN- β -1b, del estado y de su gravedad, y de la edad del ser humano a tratar, pero puede determinarse de manera rutinaria por parte de un experto ordinario en la técnica con relación a su propio conocimiento y con esta descripción.

“Tratar” o “tratamiento”, tal como se utiliza en esta memoria, cubre el tratamiento de un estado patológico en un mamífero, preferiblemente un ser humano, estado patológico que se caracteriza por síntomas asociados con la MS tal como debilidad, entumecimiento, temblor, pérdida de visión, dolor, parálisis, pérdida del equilibrio, disfunción de la vejiga y el intestino y cambios cognitivos (síntomas primarios); infecciones del tracto urinario repetidas, debilidad de desuso, deficiente alineación postural y control del tronco, desequilibrio de la musculatura, densidad ósea disminuida, respiración superficial ineficaz y llagas (síntomas secundarios); y depresión (síntomas terciarios), e incluye:

- (i) inhibir el estado, es decir, detener su desarrollo; o
- (ii) aliviar el estado, es decir, provocar la regresión del estado.

Todos los otros términos y expresiones técnicas utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente utilizado por los expertos en la técnica a los que pertenece la presente invención.

Características de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados de la invención

Las composiciones de IFN- β -1b mejoradas, preparadas mediante un procedimiento de la presente invención, comprenden polipéptidos del IFN- β -1b, o fragmentos, análogos, derivados o variantes de los mismos, que tienen al menos 2 veces, preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 6 veces, incluso más preferiblemente 8 veces, e incluso más preferiblemente al menos 10 veces una actividad específica mayor que la de una composición de IFN- β de referencia. En realizaciones preferidas, la composición de IFN- β de referencia es una composición de IFN- β -1b de referencia. En algunas realizaciones, la composición de IFN- β de referencia es

una composición de IFN- β -1a. En una realización, las composiciones de IFN- β -1b mejoradas de la presente invención tienen una actividad específica al menos 2 veces mayor que una composición de IFN- β -1b de referencia expresada en *E. coli* y purificada de acuerdo con el proceso descrito en la patente de EE.UU. n° 5.814.485.

5 Expresión y purificación de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados

Existen varias maneras de expresar y purificar IFN- β -1b humano recombinante en bacterias, en particular en *E. coli* para obtener polipéptidos del IFN- β -1b con una actividad específica mejorada. Se pueden utilizar métodos conocidos para expresar los genes clonados en bacterias. Para obtener una expresión de alto nivel de un gen eucariótico clonado en un sistema procariótico, es preferible construir vectores de expresión que contengan un promotor fuerte para dirigir la transcripción de ARNm. Ejemplos de regiones reguladoras, adecuadas para este fin, son la región del promotor y operador del gen beta-glucosidasa de *E. coli*, la vía biosintética de triptófano de *E. coli* o el promotor de la izquierda procedente del fago λ . También es útil la inclusión de marcadores de selección en plásmidos de ADN transformados en *E. coli*. Ejemplos de marcadores de este tipo incluyen los genes que especifican resistencia a ampicilina, tetraciclina o cloranfenicol.

Modificaciones post-traducción tales como la glicosilación no se producen en el sistema de expresión de células procarióticas en *E. coli*. Además, proteínas con modelos disulfuro complejos pueden plegarse erróneamente cuando se expresan en *E. coli*. Con el sistema procariótico, la proteína expresada está presente en el citoplasma de la célula en una forma insoluble, en los denominados cuerpos de inclusión, encontrados en la fracción soluble después de haber lisado la célula, o está dirigida al periplasma mediante la adición de secuencias señal de la secreción apropiadas. Si la proteína expresada se encuentra en cuerpos de inclusión insolubles, se requieren habitualmente una solubilización y un subsiguiente repliegado de los cuerpos de inclusión.

Por parte de los expertos en la técnica se conocen y están comercialmente disponibles muchos vectores de expresión procarióticos, tales como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) y pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, EE.UU.).

Promotores comúnmente utilizados en sistemas de expresión microbianos recombinantes incluyen el sistema promotor de beta-lactamasa (penicilinas) y lactosa (Chang, A.C. *et al.* (1978) *Nature* 275:617-624; y Goeddel, D.V. *et al.* (1979) *Nature* 281:544-548), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, D.V. *et al.* (1980) *supra* y el promotor *tac* (Sambrook, J.F. *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Otro sistema de expresión bacteriano útil emplea el promotor pL del fago lambda y el represor termoinducible *clts857* (Bernard, H.U. *et al.* (1979) *Gene* 5:59-76; y Love, C.A. *et al.* (1996) *Gene* 176:49-53).

El procedimiento de fabricar IFN- β -1b/Betaseron[®] y su subsiguiente análisis y ensayo de liberación se revisan en Lin, L. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 96:97-104. IFN- β -1b/Betaseron[®] es una forma de IFN- β -1b expresada en *E. coli* bajo el control del promotor de *trp*, y se produce y purifica según se describe en la patente de EE.UU. n° 5.814.485, cuya descripción se incorpora como referencia en su totalidad. En una realización, la actividad específica de preparados de IFN- β -1b de este tipo es $\sim 3 \times 10^7$ UI/mg.

Un método preferido para expresar y purificar los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados es el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. n° 5.814.485.

45 Métodos de oxidación de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados

La oxidación de proteínas recombinantes de mamíferos, expresadas en bacterias tales como los IFNs, se emplea típicamente para la formación de puentes disulfuro que son idénticos a sus homólogos que se producen de forma natural. Reactivos útiles para oxidar proteínas de mamíferos reducidas, con contenido en cisteína y expresadas en bacterias, incluyen ácido *o*-yodosobenzoico, CuCl₂ y *o*-fenantrolina, según se describe en las patentes de EE.UU. n°s 4.530.787 y 4.572.798.

Los gangliósidos pueden inhibir la actividad específica de IFN- β -1b (también denominada en esta memoria "actividad inhibidora de gangliósidos"). Un objeto de la presente invención es que la oxidación es también útil para la escisión oxidativa de hidratos de carbono que están presentes en preparados altamente purificados de proteínas de mamíferos expresadas en *E. coli* tales como IFN- β -1b. Procedimientos de este tipo de la presente invención útiles para separar (o reducir la cantidad de) gangliósidos en una composición de IFN- β -1b y/o para reducir o

inactivar la actividad inhibidora de gangliósidos y, por consiguiente, aumentar la actividad específica de las composiciones de IFN- β -1b de la presente invención.

5 Métodos para oxidar o escindir hidratos de carbono son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, la hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, oxidación con peryodato y calentamiento. La oxidación con peryodato se utiliza para oxidar monosacáridos, polisacáridos y oligosacáridos (véase, por ejemplo, Pappas, R. S. *et al.* (1990) *Carbohydr. Res.* 197:1-14 y Sussich, F. y Cesaro, A. (2000) *Carbohydr. Res.* 329:87-95) y proteínas y péptidos (véase, por ejemplo, Clamp, J.R. y Hough, L. (1965) *Biochem. J.* 94:17-24).

10 Oxidación mediante peryodato

La oxidación rápida mediante peryodato de proteínas y péptidos genera un aldehído en el péptido y se utiliza como la primera etapa en un método para el marcaje dirigido al sitio, por ejemplo con biotina, informadores fluorescentes, grupos quelantes de metales, agentes formadores de imágenes, fármacos citotóxicos o agentes estabilizantes tales como polietilenglicol (Geoghegan, K.F. y Stroh, J.G. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146). La diana para la oxidación con peryodato es la estructura del 2-amino-alcohol, -CH(NH₂)CH(OH)-, que existe en las proteínas y en los péptidos en residuos serina o treonina N-terminales y en residuos hidroxilisina.

20 El peryodato también puede oxidar varios residuos aminoácidos en proteínas, que incluyen tirosina, metionina, histidina y triptófano (Clamp, J.R. y Hough, L. (1965) *supra*). Las condiciones para la oxidación selectiva de serina o treonina N-terminal con una oxidación mínima de otros residuos aminoácidos han sido descritas, por ejemplo, en Geoghegan, K.F. y Stroh, J.G. (1992) *supra*; y Gaertner, H.F. y Offord, R.E. (1996) *Bioconjugate Res.* 7:38-44, cuyas descripciones se incorporan en su totalidad como referencia. Tres ejemplos de proteínas citoquinas de mamíferos recombinantes que han sido oxidadas selectivamente en su extremo N incluyen: (1) interleuquina-1 α ("IL-1 α "); (2) interleuquina-8 ("IL-8"); y (3) factor estimulante de la colonia de granulocitos ("G-CSF" – siglas en inglés).

(1) La serina N-terminal en IL-1 α (13 μ M) se oxidó con peryodato de sodio 40 μ M (exceso 3 veces molar) en fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,0, durante 30 minutos a 0°C. El peryodato se separó mediante filtración en gel utilizando Sephadex G-25 equilibrada con acetato de sodio 50 mM, pH 4,5. La oxidación cuantitativa del extremo N se confirmó mediante enfoque isoeléctrico. Véase Geoghegan, K.F. y Stroh, J.G. (1992) *supra*.

35 (2) La serina N-terminal en IL-8 (a razón de 2 hasta 5 mg/ml) se oxidó con un exceso de 10 veces de peryodato de sodio en tampón NH₄-HCO₃ al 1%, pH 8,3, en presencia de un exceso 50 veces molar de metionina durante 10 minutos a la temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de un exceso 2000 veces molar de etilenglicol frente a peryodato, y la disolución se incubó adicionalmente durante 15 minutos a la temperatura ambiente, luego se dializó frente a tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 4,6. Véase Gaertner, H.F. y Offord, R.E. (1996) *supra*.

40 (3) La treonina N-terminal en G-CSF (a razón de 5 mg/ml), después de la separación catalizada por aminopeptidasa de la metionina N-terminal, se oxidó con un exceso de 5 veces de peryodato en tampón NH₄-HCO₃ al 1%, pH 8,3, que contenía hidrocloreuro de guanidinio 6 M durante 10 minutos a la temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de un exceso 1000 veces molar de etilenglicol frente a peryodato. Véase Gaertner, H.F. y Offord, R.E. (1996) *supra*.

45 Métodos preferidos para oxidar los polipéptidos del IFN- β -1b incluyen los protocolos experimentales (1), (2) y (3) anteriores, que dan como resultado la oxidación del residuo serina N-terminal de IFN- β -1b, pero sin efecto perjudicial alguno sobre la actividad biológica del polipéptido, según se describe en esta memoria más abajo.

50 Análogos, fragmentos, derivados y variantes de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados

Un análogo, fragmento, derivado o variante de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados puede ser: (i) uno en el que uno o más de los residuos aminoácido están sustituidos con un residuo aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo aminoácido conservado) y un residuo aminoácido sustituido de este tipo puede o puede no ser uno codificado mediante el código genético; o (ii) uno en el que uno o más de los residuos aminoácido incluyen un grupo sustituyente; o (iii) uno en el que el polipéptido del IFN- β -1b mejorado está fusionado con otro compuesto tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido del IFN- β -1b mejorado (por ejemplo polietilenglicol); o (iv) uno en el que aminoácidos adicionales están fusionados al

5 polipéptido del IFN- β -1b mejorado maduro tal como una secuencia conductora o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido del IFN- β -1b mejorado maduro; o (v) uno en el que la secuencia del polipéptido del IFN- β -1b mejorado está fusionada con un polipéptido mayor, es *decir*, albúmina humana, un anticuerpo o Fc, para la duración o efecto incrementado. Análogos, fragmentos, derivados y variantes de este tipo se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de esta memoria.

10 Preferiblemente, los derivados contienen sustituciones de aminoácidos conservativas, realizadas en uno o más residuos aminoácidos predichos, preferiblemente no esenciales. Un residuo aminoácido “no esencial” es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo salvaje de una proteína, sin alterar la actividad biológica, mientras que para la actividad biológica se requiere un residuo aminoácido “esencial”. Una “sustitución de aminoácidos conservativa” es una en la que el residuo aminoácido está reemplazado por un residuo aminoácido con una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (*p. ej.* lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (*p. ej.* ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*p. ej.* glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (*p. ej.* alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación beta (*p. ej.* treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*p. ej.* tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Sustituciones no conservativas no se realizarían para residuos aminoácidos conservados ni para residuos aminoácidos que residen dentro de un dominio de proteína conservado. Fragmentos o porciones biológicamente activas incluyen fragmentos de polipéptidos adecuados para uso como un medicamento, como un reactivo de investigación, y similares. Fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos lo suficientemente similares a o derivadas de las secuencias de aminoácidos de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado y que exhiben al menos una actividad de ese polipéptido, pero que incluyen menos aminoácidos que los polipéptidos de longitud completa descritos en esta memoria. Típicamente, porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad del polipéptido. Una porción biológicamente activa de un polipéptido puede ser un péptido que, por ejemplo, tenga una longitud de 5 o más aminoácidos. Porciones biológicamente activas de este tipo se pueden preparar por vía sintética o mediante técnicas recombinantes y se pueden evaluar para una o más de las actividades funcionales de un polipéptido por medios descritos en esta memoria y/o bien conocidos en la técnica.

30 Derivados preferidos incluyen polipéptidos del IFN- β -1b que han sido fusionados con otro compuesto tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido y/o para reducir la inmunogenicidad potencial del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol, “PEG”). El PEG se puede utilizar para impartir solubilidad en agua, tamaño, baja tasa de aclaramiento renal, e inmunogenicidad reducida a la proteína de fusión. Véase, *p. ej.* la patente de EE.UU. nº 6.214.966. En el caso de PEGilaciones, la fusión del polipéptido del IFN- β -1b mejorado a PEG puede conseguirse por cualquier medio conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, la PEGilación puede conseguirse introduciendo primero una mutación cisteína en el polipéptido del IFN- β -1b mejorado, seguido de una derivatización específica del sitio con PEG-maleimida. El residuo cisteína se puede añadir al extremo C del polipéptido del IFN- β -1b mejorado. Véase, *p. ej.* Tsutsumi, Y. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8548-8553.

45 Variantes de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados incluyen polipéptidos con una secuencia de aminoácidos lo suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados originales. La expresión “suficientemente similar” significa una primera secuencia de aminoácidos que contiene un número suficiente o mínimo de residuos aminoácidos idénticos o equivalentes con relación a una segunda secuencia de aminoácidos, de modo que la primera y segunda secuencias de aminoácidos tienen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que es al menos aproximadamente 45%, de preferencia aproximadamente 75% a 98% idéntico se define en esta memoria como suficientemente similares. Preferiblemente, las variantes serán lo suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados preferidos. Variantes incluyen variantes de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados codificados por un polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido o un complemento del mismo bajo condiciones estrictas. Variantes de este tipo conservarán generalmente la actividad funcional de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados. Se pueden utilizar genotecas de fragmentos de los polinucleótidos para generar una población variada de fragmentos para el rastreo y la subsiguiente selección. Por ejemplo, una genoteca de fragmentos se puede generar tratando un fragmento de PCR de doble cadena de un polinucleótido con una nucleasa bajo condiciones en las que se produce una incisión sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble cadena, renaturalizando el ADN para formar ADN de doble cadena que puede incluir pares sentido/antisentido procedentes de diferentes productos con incisión, separar

porciones de cadena sencilla a partir de dúplex reformados mediante tratamiento con S1 nucleasa y ligar la genoteca de fragmentos resultantes en un vector de expresión. Mediante este método, se puede derivar una genoteca de expresión que codifique fragmentos N-terminales e internos de diversos tamaños de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados.

5 Variantes incluyen polipéptidos del IFN- β -1b mejorados que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Variantes con actividad antiviral se pueden identificar rastreando genotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes por truncación o puntuales, de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados utilizando el ensayo de inducción del gen MxA descrito bajo Ensayos para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN- β -1b.

10 En una realización, se genera una genoteca heterogénea de variantes mediante mutagénesis combinatoria al nivel de ácido nucleico y es codificada por una genoteca heterogénea. Una genoteca heterogénea de variantes se puede producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias de genes, de modo que un conjunto degenerado de secuencias de aminoácidos variantes potenciales puede ser expresado como polipéptidos individuales o, alternativamente, como un conjunto de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados mayores (por ejemplo para la exhibición de fagos) que contiene el conjunto de secuencias en su interior. Existe una diversidad de métodos que pueden utilizarse para producir genotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia de polinucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia degenerada se puede realizar en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético se puede ligar después en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias variantes potenciales. Métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, p. ej., Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura, K. *et al.* (1984a) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323-356; Itakura, K. *et al.* (1984b) *Science* 198:1056-1063; Ike, Y. *et al.* (1983) *Nucl. Acid Res.* 11:477-488).

20 En la técnica se conocen varias técnicas para el rastreo de productos génicos de genotecas combinatorias realizadas por mutaciones puntuales o truncación, y para el rastreo de genotecas de ADNc para productos génicos con una propiedad seleccionada. Técnicas de este tipo son adaptables para el rastreo rápido de las genotecas generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados para la actividad antiviral. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que están sujetas a un análisis de alto rendimiento para el rastreo de grandes genotecas, incluyen típicamente clonar la genoteca en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la genoteca resultante de vectores y expresar los genes combinatorios bajo condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recursiva (REM – siglas en inglés), una técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las genotecas, se puede utilizar en combinación con los ensayos de rastreo para identificar las variantes deseadas.

30 40 Ensayos para medir la actividad específica de polipéptidos del IFN- β -1b

45 La actividad antiviral de IFNs se puede medir cuantitativamente en términos de reducción en el rendimiento de virus o defectos citopáticos (“CPE” – siglas en inglés) inducidos por virus, p. ej. mediante la absorción vital de colorantes, en células humanas cultivadas según se describe, por ejemplo, en Pestka, S., comp., *Interferones Parte A en Meth. Enzymol.* Vol. 78, Academic Press, Inc., Nueva York, N. Y. (1981).

Ensayo del efecto citopático (CPE) antiviral

50 La actividad específica de polipéptidos del IFN- β , incluido tanto IFN- β -1a como IFN- β -1b, se puede determinar utilizando métodos descritos en esta memoria o conocidos en la técnica, p. ej., un ensayo del CPE antiviral. Un ensayo del CPE antiviral utilizado en esta memoria mide la absorción de colorantes naftol azul-negro en células de carcinoma de pulmón humano A549, infestadas por el virus de la encefalomiocarditis murina (“EMC” – siglas en inglés). Este proceso se describe en detalle en Pungor, E. Jr. *et al.* (199) *J. Interferon Res.* 18:1025-1030. Otro ensayo del CEP antiviral utilizado en esta memoria mide la reducción viral de placas en células amniónicas humanas WISH infestadas por el virus de la estomatitis vesicular (“VSV” – siglas en inglés). Se asignan unidades internacionales (“UI”) en términos de una composición de IFN- β de fibroblastos humanos NIH de referencia o una composición de IFN- β recombinante humano de referencia (Pestka, S. (1986) *supra*).

Ensayo de inducción del gen MxA

5 Basado en la inducción específica del gen MxA por IFNs de tipo I en células humanas cultivadas (Von Wussow, P. *et al.* (1990) *Eur. J. Immunol.* 20:2015-2019; y Simon, A. *et al.* (1991) *J. Interferon Res.* 11:215-219) se desarrolló un ensayo inmunoquimioluminométrico ("ICLA" – siglas en inglés) por parte de Files, J.G. *et al.* (1998) *J. Interferon Res.* 18:1019-1024. El ensayo ICLA, el cual se basa en el proceso de Oh, S.K. *et al.* (1994) *J. Immunol. Meth.* 176:79-91, detecta la proteína MxA en lisados de células utilizando los anticuerpos monoclonales anti-MxA no competitivos, uno de los cuales se conjuga con éster de acridinio, el cual es detectado en un luminómetro. El proceso en el ensayo ICLA de inducción del gen MxA utilizado en esta memoria se describe en detalle en Files, J.G. *et al.* (1998) *supra*.

Composiciones farmacéuticas

15 También se describen en esta memoria composiciones farmacéuticas que pueden ser administradas a un paciente para conseguir un efecto terapéutico. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar para la administración combinando un polipéptido del IFN- β -1b mejorado con el grado de pureza y la cantidad farmacéuticamente eficaz deseados, con soportes fisiológicamente aceptables.

20 Los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados se pueden utilizar en composiciones farmacéuticas para la administración por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o intratecal. Así, los polipéptidos arriba descritos se combinarán preferiblemente con un soporte farmacéutico estéril aceptable tal como dextrosa al cinco por ciento, solución de Ringer lactada, solución salina normal, agua estéril o cualquier otra disolución tampón fisiológica comercialmente preparada, diseñada para la infusión intravenosa. Se entenderá que la selección de la disolución del soporte, y la dosificación y administración de la composición variarán con el sujeto y el ajuste clínico particular y será gobernada por procesos médicos convencionales.

25 Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar en cantidades eficaces para inhibir o mejorar las consecuencias o síntomas patológicos asociados con la MS.

30 La administración de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados puede ser mediante inyección intravenosa en bolo, mediante infusión intravenosa constante o mediante una combinación de ambas vías. Alternativamente, o además, los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados mezclados con excipientes apropiados pueden ser tomados en la circulación a través de un sitio intramuscular.

35 Los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados y composiciones farmacéuticas son útiles para la administración por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral o local. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una diversidad de formas de dosificación unitarias dependiendo del método de administración. Por ejemplo, formas de dosificación unitarias pueden administrarse en la forma que incluye, pero no se limita a comprimidos, cápsulas, polvo, disoluciones y emulsiones.

40 Los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados y composiciones farmacéuticas son particularmente útiles para la administración por vía intravenosa. Las composiciones para la administración comprenderán habitualmente una disolución del polipéptido del IFN- β -1b mejorado disuelto en un soporte farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en un soporte acuoso. Se pueden utilizar una diversidad de soportes acuosos, *p. ej.* solución salina tamponada y similares. Estas disoluciones son estériles y generalmente están exentas de materia indeseable. Las composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas.

45 Una composición farmacéutica típica para la administración intravenosa puede ser fácilmente determinada por parte de un experto ordinario en la técnica. Las cantidades administradas con claridad específicas para la proteína y dependen de su potencia y perfil farmacocinético. Métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se describen con mayor detalle en publicaciones tales como *Remington's Pharmaceutical Science*, 18^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990).

50 Las composiciones que contienen los presentes polipéptidos del IFN- β -1b mejorados o un coctel de los mismos (es decir, con otras proteínas) se pueden administrar en tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece MS en una cantidad suficiente para curar o al menos

detener parcialmente el trastorno. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una “dosis terapéuticamente eficaz”. Cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente.

- 5 Una administración sencilla o múltiple de las composiciones puede ser administrada en función de la dosificación y la frecuencia según se requiera y tolere por parte del paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente de los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados para tratar eficazmente al paciente. En general, dependiendo del modo de administración pretendido, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán aproximadamente 1% hasta aproximadamente 99% en peso de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado, y 99% a 1% en peso de un excipiente o soporte farmacéutico adecuado. Preferiblemente, la composición consistirá en aproximadamente 5% a 75% en peso de un o más polipéptidos del IFN- β -1b mejorados, siendo el resto excipientes o soportes farmacéuticos adecuados.

- 15 Los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados o sus composiciones farmacéuticamente aceptables se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz que dependerá de una diversidad de factores, incluida la actividad específica del polipéptido del IFN- β -1b mejorado particular empleado; la estabilidad metabólica y la duración de la acción del polipéptido del IFN- β -1b mejorado; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el modo y tiempo de administración; la tasa de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad de los estados patológicos particulares; y del hospedante que esté siendo sometido a terapia. Generalmente, una dosis diaria terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,14 mg hasta aproximadamente 14,3 mg/kg de peso corporal por día de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado, preferiblemente de aproximadamente 0,7 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; y lo más preferiblemente, de aproximadamente 1,4 mg a aproximadamente 7,2 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, para la administración a una persona de 70 kg, el intervalo de dosificación sería de aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 1,0 gramos por día de un polipéptido del IFN- β -1b mejorado, preferiblemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 700 mg por día y, lo más preferiblemente, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg por día.

Indicaciones terapéuticas

- 30 Las dos formas de IFN- β , IFN- β -1a e IFN- β -1b, están aprobadas para el tratamiento de MS recurrente-remitente (Vartanian, T. (2003) *supra*). IFN- β se utiliza también para tratar verrugas genitales. Los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados son útiles en las enfermedades, trastornos o estados anteriores, y son también útiles para el tratamiento de otras formas de MS, incluida la MS progresiva secundaria, MS progresiva primaria y MS recurrente progresiva. Por “útiles” se quiere dar a entender que los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados son útiles para el tratamiento de la enfermedad, p. ej. ya sea para prevenir la enfermedad o para prevenir el progreso de la enfermedad a un estado más grave, o para mejorar o reducir un síntoma o consecuencia de la enfermedad tal como MS.

Realizaciones preferidas

- 40 De los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados según se recogen anteriormente en el Sumario de la Invención, se prefieren particularmente varios grupos de polipéptidos del IFN- β -1b mejorados.

- 45 En una realización, los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados tienen una actividad específica al menos 2 veces mayor que la de una composición de IFN- β de referencia.

En una realización preferida, los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados tienen una actividad específica al menos 4 veces mayor que la de una composición de IFN- β de referencia.

- 50 En una realización más preferida, los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados tienen una actividad específica al menos 6 veces mayor que la de una composición de IFN- β de referencia.

En una realización más preferida, los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados tienen una actividad específica al menos 8 veces mayor que la de una composición de IFN- β de referencia.

- 55 En una realización incluso más preferida, los polipéptidos del IFN- β -1b mejorados tienen una actividad específica al menos 10 veces mayor que la de una composición de IFN- β de referencia.

Los siguientes ejemplos específicos se proporcionan como una guía para ayudar a la práctica de la invención, y no pretenden ser una limitación del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

5

Comparación de la actividad de IFN- β -1a e IFN- β -1b *in vitro*

IFN- β -1a humano recombinante es un polipéptido glicosilado N-enlazado, de 166 aminoácidos de longitud, expresado en células CHO ("IFN- β -1a"). En contraposición, IFN- β -1b humano recombinante es un polipéptido no glicosilado, de 165 aminoácidos de longitud, expresado en *E. coli* ("IFN- β -1b"). El residuo metionina N-terminal en IFN- β -1a está suprimido en IFN- β -1b, de modo que el aminoácido N-terminal en IFN- β -1b es Ser2. Además, IFN- β -1b tiene Cys17 reemplazada por Ser17. La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de (A) IFN- β -1a y (B) IFN- β -1b. La actividad específica de IFN- β -1a es 2 a 3 x 10⁸ UI/mg, mientras que la actividad específica de IFN- β -1b es 2 a 3 x 10⁷ UI/mg. Se investigó la contribución relativa de la pérdida del Met N-terminal, el reemplazo de Cys17 por Ser 17, la ausencia de glicosilación N-enlazada en Asn80 y la exposición a SDS durante la purificación con respecto a la diferencia observada en la actividad específica entre IFN- β -1a e IFN- β -1b.

IFN- β -1a (obtenido de Dr. Rentschler Biotechnologie GmbH) se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando la columna de cromatografía de inmutafinidad y procesos descritos en el documento EP 0529300. IFN- β -1a_{SER17}, en que Cys17 está reemplazada por Ser 17, se construyó utilizando una tecnología de ADN recombinante convencional (véase Mark, D.F. *et al.* (1984) *supra* y la patente de EE.UU. n° 4.588.585), expresada en células CHO, y luego se purificó mediante cromatografía de afinidad según se describe para IFN- β -1a. El análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal se realizó en un secuenciador de proteínas HP G1005A, siguiendo el protocolo recomendado convencional. El residuo aminoácido N-terminal de IFN- β -1a era Met1, según se esperaba, mientras que el residuo aminoácido N-terminal de > 80% de las moléculas de IFN- β -1a_{SER17} era Ser2, similar a IFN- β -1b. El efecto de la pérdida combinada del Met1 N-terminal y el reemplazo de Cys17 por Ser17 se confirmó en el ensayo de inducción del gen MxA, según se describe bajo Ensayos para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN- β -1b. Tal como se muestra en la Figura 2A, utilizando la actividad específica del marcador del producto de IFN- β -1b/Betaseron® reconstituido en calidad de patrón de IFN, la actividad específica de IFN- β -1a era 1,45 a 3,22 x 10⁸ UI/mg, mientras que la actividad específica de IFN- β -1a_{SER17} era 1,3 a 2,4 x 10⁸ UI/mg.

IFN- β -1a_{SER17} se desglicosiló en condiciones no reductoras (SDS al 1%; NP-40 al 0,5%; y Tris-HCl 100 mM, pH 7,6) y reductoras (SDS al 1%; NP-40 al 0,5%; Tris-HCl 100 mM, pH 7,6; β -mercaptoetanol 140 mM; y ~ 10 minutos de ebullición, seguido de enfriamiento hasta la temperatura ambiente). IFN- β -1a_{SER17} no reducido y reducido se incubaron durante una noche (18 horas) con el péptido N-glicosidasa F ("PNGasa F"). Se dejó que IFN- β -1a_{SER17} reducido desglicosilado se re-oxidara espontáneamente al aire durante hasta 18 horas. La desglicosilación completa de IFN- β -1a_{SER17} se verificó mediante análisis de transferencia Western utilizando IFN- β -1b, con y sin reducción y alquilación, como patrones de migración. Tal como se muestra en la Figura 2B, utilizando el ensayo de inducción del gen MxA, la actividad específica de IFN- β -1a_{SER17} no se vio afectada de manera adversa por la incubación durante una noche sola. La reducción de IFN- β -1a_{SER17} en presencia de la SDS desnaturizante fuerte, seguida de su re-oxidación espontánea condujo a una reducción de ~ 20% en la actividad específica. La desglicosilación de IFN- β -1a_{SER17} mediada por PNGasa F, ya sea bajo condiciones no reductoras o reductoras, condujo a una disminución del 30-35% en la actividad específica.

En resumen, ni la pérdida combinada de Met1 N-terminal y el reemplazo de Cys17 por Ser17, ni la desglicosilación en Asn80 en ausencia o presencia de la SDS desnaturizante fuerte justifica la actividad específica ~ 10 veces mayor de IFN- β -1a en comparación con IFN- β -1b.

EJEMPLO 2

Inhibición de la actividad de IFN- β -1b mediada por gangliósidos *in vitro*

Experimentos utilizando preparados de IFN- β de fibroblastos parcialmente purificados indicaron que los gangliósidos inhiben la actividad antiviral de IFN- β nativo *in vitro* (Gupta, S.L. *et al.* (1984) *supra*; y Fuse, A. *et al.* (1982) *supra*). Se investigó el efecto de gangliósidos sobre la actividad biológica de IFN- β -1b *in vitro*. IFN- β -1b se preparó según se describe en la patente de EE.UU. n° 5.814.485.

En suero o plasma humano está presente una diversidad de gangliósidos. Véase, por ejemplo, Kundu, S.K. *et al.* (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 238:388-400; y Senn, H.J. *et al.* (1989) *supra*. La Figura 3 muestra las vías implicadas en la generación de gangliósidos partiendo de GM₃ (N-acetilneuroaminosil)galactosilglucosilceramida).

5 IFN-β-1b, en presencia de cantidades crecientes de gangliósidos GM₃, GM₂, GM₁, GD_{1a}, GD₃, GD_{1b} y GT_{1b} se testó en el ensayo de inducción del gen MxA, según se describe bajo Ensayos para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN-β-1b. Tal como se muestra en la Figura 3, varios de estos gangliósidos, en el intervalo micromolar (μM) bajo, eran capaces de inhibir en un 50% la capacidad de IFN-β-1b de inducir el gen MxA. En general, los gangliósidos con una actividad inhibitora más potente eran aquellos con estructuras más complejas.

10

EJEMPLO 3

Presencia de hidratos de carbono en preparados de IFN-β-1b

15 IFN-β-1b/Betaseron[®] humano recombinante, según se describe en la patente de EE.UU. n° 4.588.585, se produce en *E. coli* de acuerdo con el proceso descrito en la patente de EE.UU. n° 5.814.485. Véase Lin, L. (1998) *supra* para una revisión. La etapa final en la purificación de IFN-β-1b antes de la formulación es la cromatografía en columna en Sephadex G-75, un medio de filtración en gel dextrano reticulado y conformado en perlas. El material de la agrupación G-75 se utilizó aquí para investigar la presencia de hidratos de carbono en preparados de IFN-β-1b purificados según se describe en la patente de EE.UU. n° 5.814.485. Dos lotes de IFN-β-1b se sometieron a ensayo en cuanto a su contenido en monosacáridos.

20

Composiciones Monosacáridas de Oligosacáridos en el Material de la Agrupación IFN-β-1b G-75

25 IFN-β-1b se hidrolizó en HCl 6 M o TFA 2 M a 100°C durante 1 hora, se secó en un aparato speed vac y se reconstituyó en agua. El análisis de la composición de monosacáridos se realizó mediante cromatografía de intercambio de aniones de alto rendimiento combinada con detección electroquímica pulsada en un Dionex Glycostation (Dionex, Inc.), utilizando una columna de intercambio de aniones Carbopack PA-1 y una columna empacada Carbo-pack. El Glycostation se calibró con una mezcla de fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, galactosa, glucosa y manosa. Los monosacáridos se eluyeron en un modo isocrático (NaOH 16 mM), y la columna se lavó con NaOH 200 mM para eluir los oligosacáridos y otras especies aniónicas adsorbidas.

30

Utilizando la hidrólisis ácida con HCl 6 M, los seis monosacáridos estaban presentes en el lote A de IFN-β-1b, y fucosa, galactosa y manosa estaban presentes en el lote B de IFN-β-1b (Figura 4A). Las relaciones molares de monosacáridos totales a IFN-β-1b eran 0,58 y 0,05 en los lotes A y B, respectivamente. Estas relaciones se consideran estimaciones bajas del contenido en hidratos de carbono en los lotes de IFN-β-1b, dado que la hidrólisis ácida no es completa y algunos monosacáridos se degradan durante la hidrólisis ácida. Véase Beeley, J.G. en *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier, Nueva York, N. Y. (1985). Utilizando la hidrólisis ácida con TFA 2 M, fucosa, N-acetilglucosamina, glucosa y manosa estaban presentes en el lote A de IFN-β-1b, y fucosa, N-acetilglucosamina y galactosa estaban presentes en el lote B de IFN-β-1b (Figura 4A). Las relaciones molares de monosacáridos totales a IFN-β-1b eran 0,09 y 0,08 en los lotes A y B, respectivamente. Este resultado está en concordancia con los datos publicados de que la hidrólisis ácida en TFA es más suave que en HCl (Beeley, J.G. (1985) *supra*).

35

40

45 De las dos posibles fuentes de hidratos de carbono, la presencia de glucosa en los lotes de IFN-β-1b se explica de la mejor manera mediante la lixiviación con resina a partir de las columnas basadas en dextrano Sephacryl S-200 y Sephadex G-75 utilizadas en el proceso de purificación. En contraposición, lo más probablemente los residuos no glucosa surgen del hospedante *E. coli*.

50

Interacciones y separaciones proteína-oligosacáridos

La naturaleza de la interacción proteína de IFN-β-1b-hidrato de carbono se exploró mediante cromatografía en columna. El lote A de IFN-β-1b se purificó adicionalmente mediante cromatografía líquida a alta presión de fase inversa (RP-HPLC) utilizando columnas Vydac C4 en un sistema disolvente de agua, acetonitrilo y TFA. Después de la cromatografía, el IFN-β-1b se hidrolizó en HCl 6 M y se realizó un análisis de monosacáridos según se describe arriba. La Figura 4B muestra que la RP-HPLC no separaba los hidratos de carbono del lote A de IFN-β-1b. Sin embargo, cambió la distribución de los monosacáridos identificados, posiblemente debido a los diferentes disolventes empleados: acetato de sodio 50 mM en SDS al 0,1% en la agrupación G-75, en comparación con

55

acetonitrilo/TFA en la RP-HPLC.

Alternativamente, el lote A de IFN- β -1b se purificó adicionalmente sobre columnas de exclusión por tamaño NAP 10 y Sephadex G-25, con HCl 5 mM y NaOH 1,5 mM en las fases móviles, respectivamente. La Figura 4B muestra que ni la cromatografía de exclusión por tamaño NAP 10 ni G-25 separaba hidratos de carbono del lote A de IFN- β -1b, a pesar de que, tal como se encontró para RP-HPLC, cambió la distribución de los monosacáridos identificados. La información cuantitativa debería tomarse con precaución, ya que los disolventes son diferentes para cada uno de los sistemas cromatográficos, y en cada caso difería el grado de hidrólisis de oligosacáridos.

El lote A de IFN- β -1b también se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna de Concanavalina A ("Con A") Sepharose, utilizando los sistemas de suministro de disolvente FPLC y detector de UV de Pharmacia. La columna Con A Sepharose se equilibró en tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 500 mM, CaCl₂ 1 mM y MnCl₂ 1 mM), se cargó con 5 mg de lote A de IFN- β -1b y luego se re-equilibró y lavó ampliamente con tampón A. La elución se realizó mediante gradiente continuo entre tampón A y tampón B (tampón A + α -metil-D-manosapiranosido 500 mM). Muestras de las fracciones de gradiente se dializaron frente al agua, se secaron en un dispositivo speed vac y se reconstituyeron en acetato de sodio 50 mM en SDS al 0,1% o se reconstituyeron en HCl 6 M, y se sometieron al análisis de monosacáridos según se describe arriba.

La Figura 4B muestra que el pico de IFN- β -1b (fracción 5) procedente de la columna Con A Sepharose contiene glucosa, la cual se lixivia de la columna, y manosa. La columna Con A Sepharose separaba eficazmente los amino-azúcares del material del lote A de IFN- β -1b. La mayoría de los oligosacáridos presentes en el material de partida de IFN- β -1b se separó mediante cromatografía en columna de Con A Sepharose, indicando que la interacción proteína de IFN- β -1b-hidrato de carbono es predominantemente, si no por completo, no covalente.

El pico de IFN- β -1b (fracción 5) procedente de la columna Con A Sepharose se sometió seguidamente a ensayo en cuanto a la actividad antiviral. Utilizando el ensayo CPE WISH, que mide la reducción de la placa viral mediante IFNs de tipo I en la línea de células amniónicas humanas WISH infestadas con VSV, la actividad específica era 3,6 x 10⁷ UI/mg. Esta actividad específica es al menos similar a la del material de partida de IFN- β -1b, indicando que puede ser beneficiosa la separación de hidratos de carbono a partir de preparados de IFN- β -1b.

Caracterización de oligosacáridos mediante unión con lectina

Finalmente, el lote A de IFN- β -1b se sometió a ensayo en cuanto a la unión a lectinas biotiniladas procedentes de Vector Laboratories. De las seis lectinas sometidas a ensayo, Con A, lectina de Datura Stramonium ("DSL"), jacalina, aglutinina de soja ("SBA"), lectina II de Maackia Amurensis ("MAL II") y aglutinina de Dolichos Biflorus ("DBA"), solamente DSL no reaccionaba con IFN- β -1b que fue transferida por puntos sobre nitrocelulosa. Este resultado es consistente con el análisis de la composición de monosacáridos anterior. El pico de IFN- β -1b (fracción 5) tampoco reaccionaba ya con SBA, consistente con la separación eficaz de hidratos de carbono a partir del material del lote A de IFN- β -1b.

En resumen, preparados de IFN- β -1b tienen hidratos de carbono fácilmente detectables en forma de oligosacáridos que están fijados predominantemente, si no por completo, de manera no covalente a IFN- β -1b purificado. La cantidad y calidad de los hidratos de carbono parecen variar entre los preparados de IFN- β -1b. La fuente de hidratos de carbono es la cepa de producción de *E. coli* hospedante y no el proceso de purificación propiamente dicho. El hidrato de carbono se puede ampliamente separar mediante cromatografía en columna de Con A Sepharose, y su separación no afecta adversamente y, posiblemente, puede ser beneficiosa para la actividad biológica de IFN- β -1b.

EJEMPLO 4

Actividad biológica de IFN- β -1b oxidado *in vitro*

IFN- β -1b, expresado y purificado según se describe en la patente de EE.UU. n° 5.814.485 se trata con el agente oxidante peryodato de sodio bajo una diversidad de condiciones experimentales, según se describe bajo Métodos de Oxidación de Polipéptidos del IFN- β -1b Mejorados. La actividad específica de IFN- β -1b oxidado se determina utilizando el ensayo de inducción del gen MxA *in vitro*, según se describe bajo Ensayos para Medir la Actividad Específica de Polipéptidos del IFN- β -1b. Tres ejemplos de citoquinas de mamíferos recombinantes que han sido oxidadas con peryodato de sodio, sin afectar adversamente a su actividad biológica, incluyen IL-8, G-CSF e IL-1 α

(Geoghegan, K.F. y Stroh, J.G. (1992) *supra*; y Gaertner, H.F. y Offord, R.E. (1996) *supra*).

Después de la oxidación, el IFN- β -1b se re-purifica mediante cromatografía en columna, por ejemplo en una columna de exclusión por tamaño Sephadex G-75, según se describe en la patente de EE.UU. n° 5.814.485. La separación de hidratos de carbono a partir de los preparados de IFN- β -1b oxidados se evalúa mediante el análisis de su composición de monosacáridos después de la hidrólisis ácida en HCl 6 M, según se describe en el Ejemplo 3. La actividad específica de los preparados de IFN- β -1b oxidados se determina luego utilizando el ensayo de inducción del gen MxA.

En este ensayo *in vitro*, el IFN- β -1b oxidado exhibe cualitativamente la misma función biológica que IFN- β -1b. Cuando se oxida de esta manera, la actividad específica de IFN- β -1b oxidado aumenta al menos 2 veces, preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 6 veces e incluso más preferiblemente 10 veces, en comparación con IFN- β -1b.

15 EJEMPLO 5

Actividad biológica de IFN- β -1b oxidado *in vivo*

La encefalomielitis alérgica experimental ("EAE") en roedores se utiliza ampliamente como un modelo para MS. Véase, por ejemplo, Swanborg, G. (1995) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 77:4-13; y Martin, R. y McFarland, H. (1996) *Springer Semin. Immunopathol.* 18:1-24. IFN- β -1b muestra eficacia *in vivo* en estos modelos de EMS relevantes. Al utilizar estos modelos, el IFN- β -1b oxidado de esta invención demuestra cualitativamente la misma función biológica que IFN- β -1b que se expresa y purifica según se describe en la patente de EE.UU. n° 5.814.485.

25 Encefalomielitis alérgica experimental de transferencia pasiva en ratones SJL

Animales y materiales: ratones SJL hembras de 8 semanas de edad (Jackson Laboratories); RPMI 1640, con L-glutamina y HEPES 25 mM, 1X, filtrado a través de 0,1 micras (Life Technologies); FBS, definido (Hyclone, inactivado por calor); disolución de aminoácidos no esenciales MEM, 10 mM, 100X (Life Technologies); 2- β -mercaptoetanol, 1000X, $5,5 \times 10^{-2}$ M en D-PBS (Life Technologies); penicilina/estreptomicina ("Pen/Strep"), 10.000 U/ μ g por cada ml (Bio-Whittaker); solución salina equilibrada de Hank, 1X, filtrado a través de 0,1 micras (Life Technologies).

Ratones SJL hembras de ocho semanas de edad se inmunizan con 0,1 ml de inyección subcutánea (dividida entre la base de la cola y el lomo superior) que contiene 150 μ g de proteína proteolípida ("PLP") en adyuvante completo de Freund ("CFA" – siglas en inglés) con 200 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (fondo). Once días más tarde se escinden células del nódulo linfático axiales, braquiales e inguinales de los ratones y se cultivan a razón de 6×10^6 células/ml en los siguientes medios (hasta 450 ml de RPMI 1640 (con L-glutamina más HEPES) añadir 50 ml de FBS, 0,455 ml de 2- β -mercaptoetanol, 5,0 ml de Pen/Strep y 5,0 ml de aminoácidos no esenciales. PLP se añade a las células para obtener una concentración final de 50 μ g/ml. Las células se incuban durante 72 horas a 37°C, 7% de CO₂. Las células se recolectan y se lavan dos veces en HBSS. La viabilidad de las células del nódulo linfático se confirma mediante exclusión de azul tripano. La concentración de células del nódulo linfático se ajusta a 4×10^7 células por cada ml. 2×10^7 células del nódulo linfático se inyectan por vía intraperitoneal (volumen de dosis = 0,5 ml) por cada ratón, en ratones SJL hembras de 8 semanas de edad nativos. Los ratones se pesan y se puntúan diariamente. El tratamiento con IFN- β -1b e IFN- β -1b oxidado se administra según sea necesario. Evaluación clínica (puntuación/síntomas de EAE): 0/normal; 1/cola lacia; 2/dificultad en mantenerse erguido; 3/parálisis incompleta de una o de las dos extremidades posteriores; 4/parálisis completa de una o de las dos extremidades posteriores; 5/inmóvil, moribundo o muerto.

50 Encefalomielitis alérgica experimental aguda en ratas Lewis

Animales y materiales: ratas Lewis hembras (Charles River), inmunizadas a las 8 semanas de edad; preparado del homogenizado de la médula espinal (procedente de cobayas Hartley machos, Simonsen Labs): cobayas de 500-700 g se eutanizan con CO₂. Se retiran las médulas espinales utilizando tijeras para cortar huesos afiladas para cortar las vértebras, se aclaran en solución salina, se transfieren una vez y se almacenan a -80°C hasta el día de utilizarse. Después, las médulas espinales se pesan y homogeneizan con solución salina a razón de 1 g/ml de solución salina; emulsión de antígenos: el homogeneizado de la médula espinal del cobaya se mezcla en la relación 1:1 con CFA (Difco) con 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (molido con un mortero y mano de

almirez). Se inyectan 0,05 ml en cada una de las almohadillas plantares de las extremidades posteriores para un total de 0,1 ml por rata.

5 Ratas Lewis hembras de ocho semanas de edad se inmunizan con una inyección en bolo única el día 1. Las ratas se pesan y puntúan diariamente. El tratamiento con IFN-β-1b e IFN-β-1b oxidado se administra según sea necesario. Evaluación clínica (puntuación/síntomas de EAE): 0/normal; 1/cola lacia; 2/parálisis incompleta de una
10 extremidad posterior o las dos extremidades posteriores; 3/ parálisis completa de una extremidad posterior o las dos extremidades posteriores se pueden mover, pero no ayudan al movimiento del cuerpo; 4/parálisis completa de las dos extremidades posteriores; 5/parálisis completa de las extremidades posteriores y debilidad de una o las dos extremidades anteriores, o moribundo o muerte.

15 En estos ensayos *in vivo* el IFN-β-1b oxidado exhibe cualitativamente la misma función biológica que IFN-β-1b. Cuando se oxida de esta manera, la actividad específica de IFN-β-1b oxidado aumenta al menos 2 veces, preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 6 veces e incluso más preferiblemente 10 veces, en comparación con IFN-β-1b.

EJEMPLO 6

20 Este Ejemplo ilustra la preparación de composiciones farmacéuticas representativas para la administración oral, que contienen un polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

A.	<u>Ingredientes</u>	<u>% p/p</u>
	Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención	20,0%
	Lactosa	79,5%
25	Estearato de magnesio	0,5%

30 Los ingredientes anteriores se mezclan y dispensan en cápsulas de gelatina de envuelta dura que contienen 100 mg cada una, una cápsula se aproximaría a una dosificación diaria total.

B.	<u>Ingredientes</u>	<u>% p/p</u>
	Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención	20,0%
	Estearato de magnesio	0,9%
	Almidón	8,6%
35	Lactosa	69,6%
	PVP (polivinilpirrolidina)	0,9%

40 Los ingredientes anteriores, con la excepción del estearato de magnesio, se combinan y granulan utilizando agua en calidad de agente granulante. Después, la formulación se seca, se mezcla con el estearato de magnesio y se transforma en comprimidos con una máquina de comprimidos apropiada.

C.	<u>Ingredientes</u>	
	Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención	0,1 g
	Propilenglicol	20,0 g
45	Poli(etil)englicol 400	20,0 g
	Polisorbato 80	1,0 g
	Agua	c.s. 100 mL

50 El polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención se disuelve en propilenglicol, poli(etil)englicol 400 y polisorbato 80. Luego se añade con agitación una cantidad suficiente de agua para proporcionar 100 mL de la disolución, la cual se filtra y embotella

D.	<u>Ingredientes</u>	<u>% p/p</u>
	Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención	20,0%
55	Aceite de cacahuete	78,0%
	Span 60	2,0%

Los ingredientes anteriores se funden, mezclan y se llenan en cápsulas elásticas blandas.

5	E. <u>Ingredientes</u> Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención Metil o carboximetil-celulosa Solución salina al 0,9%	<u>% p/p</u> 1,0% 2,0% c.s. 100 mL
---	---	---

El polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención se disuelve en la celulosa/solución salina, se filtra y se embotella para el uso.

10 EJEMPLO 7

Este Ejemplo ilustra la preparación de una formulación farmacéutica representativa para la administración parenteral, que contiene un polipéptido del IFN-β-1b de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

15	<u>Ingredientes</u> Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención Propilenglicol Polietilenglicol 400	0,02 g 20,0 g 20,0 g
20	Polisorbato 80 Solución salina al 0,9%	1,0 g c.s. 100 mL

25 El polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención se disuelve en propilenglicol, polietilenglicol 400 y polisorbato 80. Después se añade con agitación una cantidad suficiente de solución salina al 0,9% para proporcionar 100 mL de la disolución I.V., la cual se filtra a través de un filtro de membrana de 0,2 μm y se envasa en condiciones estériles.

30 EJEMPLO 8

Este Ejemplo ilustra la preparación de una composición farmacéutica representativa en forma de supositorio, que contiene un polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

35	<u>Ingredientes</u> Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención Polietilenglicol 1000 Polietilenglicol 4000	<u>% p/p</u> 1,0% 74,5% 24,5%
----	--	--

40 Los ingredientes se funden juntos y se mezclan en un baño de vapor y se vierten en moldes con un peso total de 2,5 g.

EJEMPLO 9

45 Este Ejemplo ilustra la preparación de una formulación farmacéutica representativa para insuflación, que contiene un polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

50	<u>Ingredientes</u> Polipéptido del IFN-β-1b micronizado mejorado de la invención Lactosa micronizada	<u>% p/p</u> 1,0% 99,0%
----	---	-------------------------------

Los ingredientes se muelen, mezclan y envasan en un insuflador equipado con una bomba dosificadora.

EJEMPLO 10

55 Este Ejemplo ilustra la preparación de una formulación farmacéutica representativa en forma nebulizada, que contiene un polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

<u>Ingredientes</u>	<u>% p/p</u>
---------------------	--------------

Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención	0,005%
Agua	89,995%
Etanol	10,000%

5 El polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención se disuelve en etanol y se combina con agua. La formulación se envasa luego en un nebulizador equipado con una bomba dosificadora.

EJEMPLO 11

10 Este Ejemplo ilustra la preparación de una formulación farmacéutica representativa en forma de aerosol, que contiene un polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

	<u>Ingredientes</u>	<u>% p/p</u>
15	Polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención	0,10%
	Agente propulsor 11/12	98,90%
	Ácido oleico	1,00%

20 El polipéptido del IFN-β-1b mejorado de la invención se dispersa en ácido oleico y los agentes propulsores. La mezcla resultante se vierte luego en un recipiente aerosol equipado con una válvula dosificadora.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nestaas, Eirik
 Pungor, Erno
 5
 <120> Polipéptidos del interferón-β-1b humanos recombinantes mejorados
 <130> 53117AWOM1
 10 <160> 2
 <170> PatentIn Versión 3.2
 <210> 1
 15 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 20
 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

ES 2 393 783 T3

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

5

<400> 2

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Ser 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

10

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento que comprende disminuir la actividad inhibidora de gangliósidos en una composición que comprende un polipéptido del IFN- β -1b para obtener una composición que tenga una actividad específica de IFN- β -1b mayor en comparación con una composición de IFN- β de referencia, en el que dicha disminución de dicha actividad inhibidora de gangliósidos se realiza mediante oxidación selectiva de dicho polipéptido del IFN- β -1b, en donde dicho procedimiento comprende separar gangliósidos a partir de dicha composición, de modo que esté sustancialmente exenta de gangliósidos.
- 10 2.- El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha oxidación selectiva es mediante calor, oxidación química o enzimática.
- 15 3.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha oxidación química se realiza mediante un agente oxidante seleccionado de un grupo que consiste en peryodato de sodio, ácido o-yodosobenzoico, CuCl_2 y o-fenantrolina.

Figura 1

	1	10	20	30	40	50	60
(A) IFN- β -1a	MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIY						
(B) IFN- β -1b	MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIY						
	61	70	80	90	100	110	120
(A) IFN- β -1a	EMLQNI FAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL						
(B) IFN- β -1b	EMLQNI FAIFRQDSSSTGWN ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSL						
	121	130	140	150	160	166	
(A) IFN- β -1a	HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FYFINRLTG YLRN						
(B) IFN- β -1b	HLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRN FYFINRLTG YLRN						

Figura 2

(A)

Muestra de IFN-β-1^a	Actividad Específica^{#A} (UI/mg)
IFN-β-1a expresado en células CHO	1,45 a 3,22 x 10 ⁸
IFN-β-1a _{SER17} expresado en células CHO	1,3 a 2,4 x 10 ⁸

La actividad específica de la etiqueta del producto de IFN-β-1a/Betaseron® se utilizó como patrón de referencia del IFN

^A Intervalo de cuatro determinaciones independientes

(B)

Muestra de IFN-β-1a_{SER17}	Actividad Específica^A (UI/mg)	Actividad de la Inducción del Gen MxA*
IFN-β-1a _{SER17} no tratado	2,44 x 10 ⁸	100
IFN-β-1a _{SER17} con 18 horas de incubación sin PNGasa F	2,48 x 10 ⁸	101
IFN-β-1a _{SER17} con 18 horas de incubación con PNGasa F	1,64 x 10 ⁸	68
IFN-β-1a _{SER17} reducida	1,94 x 10 ⁸	82
IFN-β-1a _{SER17} reducida con 18 horas de incubación sin PNGasa F	1,98 x 10 ⁸	84
IFN-β-1a _{SER17} reducida con 18 horas de incubación con PNGasa F	1,33 x 10 ⁸	57

^A Media de dos series independientes de de experimentos

* Actividad total de la inducción del gen MxA con relación a IFN-β-1a_{SER17} no tratado

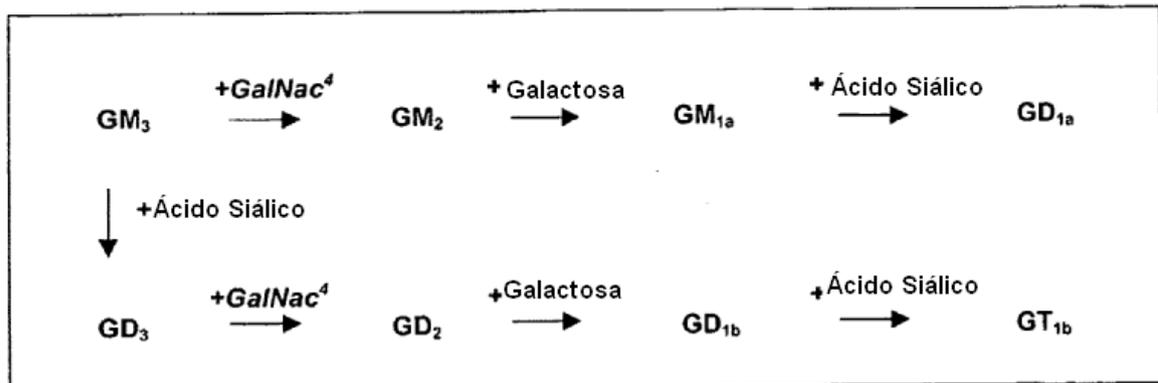
Figura 3

Gangliósido	Gangliósido en Suero (μM) ¹	Ácido siálico en Suero (μM) ¹	Nº de residuos de Ácido Siálico	Concentración (μM) para inhibición del 50%
GM ₃	4,78	4,78	1	ninguna
GM ₂	0,73	0,73	1	20
GM ₁	ND	ND	1	14
GD _{1a}	0,42	0,83	2	7,5
GD ₃	1,35	2,70	2	12
GD ₂	ND	ND	2	NT
GD _{1b}	0,10	0,21	2	6,5
GT _{1b}	0,10	0,31	3	9
MG-3	0,42	0,42	1	NT
MG-4	0,21	0,21	1	NT
Total	8,42	10,5		

¹Tabla 4 en Senn, H.J. et al. (1989) *Eur. J. Biochem.* 181:657-662

² ND, no detectado

³ NT, no testado



⁴N-acetilgalactosamina

Figura 4

(A)

Monosacárido	Lote A de IFN- β -1b HCl 6 M ¹	Lote B de IFN- β -1b HCl 6 M ¹	Lote A de IFN- β -1b TFA 2 M ¹	Lote B de IFN- β -1b TFA 2 M ¹
Fucosa	202	24	196	223
N-acetilgalactosamina	669			
N-acetilglucosamina	134		50	5
Galactosa	68	39		48
Glucosa	410		5	
Manosa	418	98	33	
Total	1901	161	284	276

¹ Los resultados se muestran en pmol, en que se hidrolizaron 650 μ g (o 32,5 nmol) de IFN- β -1b y se analizó 1/10 de la muestra.

(B)

Monosacárido	Lote A de IFN- β -1b RP-HPLC ¹	Lote A de IFN- β -1b NAP 10 ¹	Lote A de IFN- β -1b G-25 ¹	Lote A de IFN- β -1b Con A ²
Fucosa	193	292		
N-acetilgalactosamina	235	39		
N-acetilglucosamina	1060	276	618	
Galactosa	74	37	201	
Glucosa	11	22	12	6008
Manosa	98	97	231	422
Total	1671	763	1062	6430

¹ Los resultados se muestran en pmol, en que se hidrolizaron 650 μ g (o 32,5 nmol) de IFN- β -1b y se analizó 1/10 de la muestra.

² Los resultados se muestran en pmol, en que se hidrolizaron 3 mg (o 150 nmol) de IFN- β -1b y se analizó 1/10 de la muestra.