

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 846**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2006 E 12154308 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2476428**

54 Título: **Mutantes de Interferón alfa 2 (IFN alfa 2) recombinante**

30 Prioridad:

29.06.2005 US 694810 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SCHREIBER, GIDEON;
ROISMAN, LAILA C.;
JAITIN, DIEGO y
KALIE, EYAL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 435 846 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

Mutantes de Interferón alfa 2 (IFN alfa 2) recombinante

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a mutantes de interferón $\alpha 2$ (IFN $\alpha 2$) recombinante, con una actividad agonista específica mejorada en comparación con el IFN $\alpha 2$ de tipo salvaje, y con composiciones farmacéuticas de los mismos, útiles para el tratamiento o la prevención del cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y trastornos asociados al aumento de la expresión del IFN $\alpha 2$.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En 1957, Isaacs y Lindenmann descubrieron los interferones (IFNs), que reciben su nombre debido a su capacidad para interferir en la proliferación viral. Los interferones pueden también combatir las infecciones bacterianas y parasitarias, inhiben la división celular, inhiben la apoptosis espontánea y mejoran o impiden la diferenciación de las células. Se reconocen en base a su especificidad del receptor dos tipos de interferones: Tipo I y Tipo II. Los interferones de Tipo I son una familia de proteínas monoméricas que incluyen IFN α y IFN ω que son productos de los leucocitos, el IFN - β es producido por fibroblastos y el IFN- τ se ha descrito sólo en especies de ungulados.

El único interferón conocido de Tipo II es el IFN- γ dimerico, producido exclusivamente por los linfocitos. La familia del interferón alfa se compone de 13 genes sin intrones traducidos completamente (excluyendo a los pseudogenes). Cada miembro incluye proteínas maduras de 165 o 166 residuos de aminoácidos con dos puentes de disulfuro conservado: Cys11 - Cys98 y Cys29 - Cys138. Se muestra un nivel alto de las homologías de secuencias (80 %) entre diversos subtipos de interferón alfa, existiendo aproximadamente un 35 % de homología entre estos subtipos y el IFN - β . A pesar de la alta homología de los diferentes subtipos, sus actividades biológicas, entre ellas la actividad antiproliferativa, antiviral y la inmunomodulación, difieren especialmente.

Se ha resuelto la estructura de varios interferones de Tipo I incluyendo el IFN β - murino (1IFA, 1RMI), IFN - β humano (1AU1), IFN - $\alpha 2$ humano (1RH2, 1ITF) e IFN- τ ovino (1B5L). Estructuralmente, los interferones son miembros de la familia de la citocina α - helicoidal. Todos los interferones de Tipo I se indican a través de un complejo receptor común compuesto por IFNAR1 e IFNAR2. El mayor componente de unión de ligando del receptor del interferón de Tipo I es IFNAR2, con una afinidad de unión de ~ 10 nM para el IFN - $\alpha 2$. La estructura de la parte extracelular del IFNAR2 se compone de dos dominios de tipo inmunoglobulina con un área de unión del IFN - $\alpha 2$ localizada en el extremo N-terminal y en el lazo de conexión.

El IFNAR1 maduro es una proteína de 530 aminoácidos con un segmento transmembrana compuesto por 21 residuos y un dominio citoplasmático de 21 residuos. Se desconoce la estructura de la parte extracelular de IFNAR1, pero desde la secuencia uno se puede deducir que se compone de cuatro dominios de tipo inmunoglobina. Es débil la unión del IFN - $\alpha 2$ con IFNAR1, siendo la afinidad medida en una membrana artificial de 1,5-5 μ M. Son idénticos un 68 % el IFNAR1 bovino (BoIFNAR1) y el IFNAR1 humano (HuIFNAR1). Los subdominios 2 y 3 de HuIFNAR1 han demostrado que desempeñan un papel crítico en la unión del IFN - $\alpha 2$. Se incrementó sustancialmente la afinidad por el intercambio de estos subdominios con el BoIFNAR1 homólogo. El BoIFNAR1 soluble puede unirse a interferones humanos con una afinidad de 10 nM, 500 veces mayor que la del HuIFNAR1. Las células muñidas que expresan IFNAR2 se unen al IFN - $\alpha 2$ con una afinidad de 8 nM, mientras que las células que sólo expresan IFNAR1 no muestran unión al ligando. Tras la coexpresión de IFNAR1 e IFNAR2, se observó un incremento de 10 veces en la afinidad para el IFN - $\alpha 2$.

Utilizando estudios *in vitro* en membranas artificiales, se demostró que la magnitud del aumento inducido del IFNAR1 en la afinidad de unión del complejo ternario se refiere a la concentración superficial relativa de este receptor. La ubicación del área de unión del IFNAR1 en un interferón se mapeó en el IFN - β para ubicarse en las hélices B, C y D y en el lazo DE, mientras que la mutagénesis mediante Ala del IFN - $\alpha 2$ sugiere que el área de unión del IFNAR1 se limita a las hélices B y C.

Varios estudios sugieren que la formación del complejo ternario se produce en un modo secuencial, comenzando con la unión del interferón IFNAR2 para formar un complejo intermedio, seguido por el redutamiento del IFNAR1. El complejo IFNAR1 - IFN - α - IFNAR2 ha mostrado tener una estequiometría de 1 :1 :1. El receptor IFNAR1 es un componente esencial del complejo receptor del interferón, con una mutación nula de un IFNAR1, o la adición del neutralizante Ab contra este receptor que da como resultado una falta completa de respuestas antivirales y antiproliferativas al IFN - α e IFN - β .

La asociación del IFNAR1 e IFNAR2 estimula la activación de las quinasas intracelulares constitutivamente asociadas a Jak1 y Tyk2, que conduce a una cascada de fosforilación de tirosina que es resultado de la dimerización de los transductores de señales y activadores de transcripción (STATs), y el transporte al núcleo, donde se unen a secuencias específicas de ADN y estimulan la transcripción de cientos de genes receptivos.

El interrogante sigue siendo cómo los IFNs muy similares inducen actividades diferenciales en el mismo tipo de células. Se ha sugerido que las actividades biológicas de los diferentes subtipos de IFN - α se correlacionan con sus respectivas afinidades de unión y el tipo celular utilizado.

5 Los interferones de Tipo I vertebrados son reconocidos por un solo receptor compartido, compuesto por dos proteínas transmembranales (IFNAR1 e IFNAR2), que muestran su actividad a través de sus quinasas Jak asociadas con los factores de transcripción STAT como sus objetivos principales (Brierley, M.M. & Fish, E. N. 2002. *J Interferon Cytokine Res.* 22, 835 - 845). Típicamente reconocidos por los plegamientos de inmunoglobulina de tipo G G de sus dominios extracelulares (dominios hCR), el IFNAR2 e IFNAR1 son considerados respectivamente como proteínas de unión y factores de transducción accesorios; es decir, las cadenas alfa y beta de los receptores heteroméricos. Está implícita en la definición una diferencia en las constantes de disociación en el ligando de las dos cadenas. Sin embargo, ambas contribuyen a la creación de áreas de unión de alta afinidad. La combinación de una cadena beta "común" con cadenas de reconocimiento diferentes, es una característica de los receptores heteroméricos que responden de manera diferente a diferentes ligandos. La capacidad de interactuar con diferentes cadenas alfa, establece conexiones de red potenciales para la expresión del receptor diferencial (Kotenko, S. V. & Langer, J. A. 2004. *Int Immunopharmacol* 4, 593 - 608). Cuando estas, al igual que IFNAR1, poseen la capacidad de interactuar con los elementos de las diferentes vías de señalización, pueden establecer conexiones para la expresión génica diferencial (Platanias, L. C. & Fish, E. N. 1999. *Experimental Hematology* 27, 1583 - 1592).

10 Los IFNs humanos cuentan con 2 proteínas alfa no alélicas diferentes, una beta y una omega. Como era de esperar, en una familia con homología de secuencia marcada, una estructura de núcleo 3D compartida y un receptor compartido se superponen a las actividades de los IFNs de Tipo I. Sin embargo, pueden reconocerse e incluso clasificarse por sus diferencias en los aminoácidos y se han observado en los numerosos ejemplos de diferencias relativas en la actividad. La divulgación resultante es que las diferencias funcionales sólo aparecen en contextos fisiológicos específicos. Además de su acción local para conferir protección antiviral a casi cualquier célula, están relacionadas al desarrollo de la segunda línea de defensas antivirales. Se observó una posible diferencia entre los IFNs que podrían tener potencial para unirse fuertemente al IFNAR1 (Roisman et al., 2005. *J Mol Biol.* 353, 271 - 281).

15 Durante varios años han sido objeto de intensas investigaciones las actividades diferenciales del los IFNs del Tipo I. En particular, se observó que el IFN - β tiene un repertorio adicional de actividades a través del IFN- α . El análisis detallado de las diferencias entre estos dos IFNs muestran que el IFN - β posee una mayor actividad general en la activación de la transcripción de los genes receptivos del IFN, y se activa para reducir los niveles del IFN. Los estudios de unión sugieren que la afinidad hacia la subunidad accesoria del IFNAR1 es la clave de las diferencias entre el IFN - α y el IFN - β (Jaitin, 2006. *Moll Cell Biol.* 26, 1888 - 1897).

20 El IFN- α es conocido por poseer efectos anticancerígenos. Sin embargo, el tratamiento no siempre es eficaz y a veces da lugar a efectos secundarios intolerables relacionados con la dosis y la duración del tratamiento. La patente WO 97/12630 revela en pacientes con cáncer el tratamiento con temozolomida en combinación con IFN - α 2. La patente WO 01/54678 revela en pacientes con cáncer el tratamiento con temozolomida e interferón pegilado.

25 La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es la infección transmitida por sangre más común en Estados Unidos. Aunque ha descendido el número de nuevas infecciones, es considerable la carga de infección crónica; el Centro de Control de Enfermedades estima que hay 3,9 millones de personas infectadas (1,8 %) en Estados Unidos. La enfermedad hepática crónica es la décima causa de muerte entre los adultos en Estados Unidos y es responsable de aproximadamente 25.000 muertes anuales, o aproximadamente el 1% de todas las muertes. Los estudios indican que el 40 % de la enfermedad hepática crónica está relacionada con el VHC, dando como resultado una estimación de 8.000 - 10.000 muertes cada año. La enfermedad hepática terminal asociada al VHC es la indicación más frecuente para el trasplante de hígado en adultos.

30 La terapia antiviral de la hepatitis C crónica ha evolucionado rápidamente durante la última década con mejoras significativas observadas en la eficacia del tratamiento. Sin embargo, incluso con el tratamiento combinado con IFN - α pegilado más ribavirina, el 40 % o 50 % de los pacientes no responden al tratamiento; es decir, no son respondedores o recidivantes. Estos pacientes no tienen actualmente ninguna alternativa terapéutica eficaz. En particular, los pacientes con fibrosis avanzada o cirrosis, en la biopsia hepática, poseen un riesgo significativo de desarrollar complicaciones en la enfermedad hepática avanzada, incluyendo ascitis, ictericia, hemorragia por varices, encefalopatía e insuficiencia hepática progresiva, así como un notable aumento del riesgo de carcinoma hepatocelular.

35 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, neurológica, autoinmune y desmielinizante. La EM puede causar visión borrosa, pérdida de visión unilateral (neuritis óptica), pérdida del equilibrio, falta de coordinación, dificultad para hablar, temblores, entumecimiento, fatiga extrema, cambios en la función intelectual (como la memoria y la concentración), debilidad muscular, parestesias y ceguera. Muchos sujetos desarrollan discapacidades progresivas crónicas, pero largos periodos de estabilidad clínica pueden interrumpir los periodos de deterioro.

Los déficits neurológicos pueden ser permanentes o evanescentes. La patología de la EM se caracteriza por una respuesta inmune anormal dirigida contra el sistema nervioso central. En particular, se activan los linfocitos t contra la vaina de mielina del sistema nervioso central causante de la desmielinización. En el proceso de desmielinización, se destruye y se reemplaza la mielina por las cicatrices del tejido endurecido "escleroso", conocido como placa. Estas lesiones aparecen en zonas dispersas del cerebro, el nervio óptico y la médula espinal. Los dos tipos de interferón-beta aprobados en Estados Unidos para el tratamiento de la EM son el interferón - beta 1a y el interferón - beta 1b.

La diabetes de Tipo I, conocida también como diabetes autoinmune o diabetes mellitas insulino dependiente (DMID), es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción selectiva de las células pancreáticas por los linfocitos T autoreactivos (Bach, 1994, Endocr. Rev. 15:516 - 542). Es muy compleja la patología de la DMID, ya que implica una interacción entre un evento epigenético (posiblemente una infección viral), las células de los islotes pancreáticos y el sistema autoinmune en un huésped genéticamente susceptible. Se han implicado en la patogénesis de la DMID en modelos de enfermedad humanos y animales un número de citocinas que incluyen IFN- α e IFN- γ (Campbell et al.; 1991, J. Clin. Invest. 87:739 - 742).

La expresión local del IFN- α en las células de los islotes pancreáticos en respuesta a los estímulos potenciales diabéticos, tales como los virus pueden desencadenar el proceso insulínico.

La patente WO9304699 revela un procedimiento para el tratamiento de diabetes mellitas insulino dependiente que comprende la administración de un IFN- α antagonista.

Basado en el aumento del nivel de la expresión del IFN - α en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), el IFN - α se implica en la patogénesis de LES (Ytterberg and Schnitzer, 1982, Arthritis Rheum. 25: 401 - 406).

La patente WO02066649 revela anticuerpos específicos anti IFN - α para el tratamiento de diabetes mellitas insulino dependiente (DMID) y el lupus eritematoso sistémico (LES).

La solicitud de publicación de la patente de US N° 20040230040 revela variantes de cisteína del interferón - α 2. La solicitud de publicación de la patente de US N° 20040002474 revela homólogos de interferón - α con actividad antiproliferativa en ensayos en las líneas celulares daudi humanas.

La patente de US N° 4.588.585 revela un IFN - β - 1b mutado en el que Cys17 se cambia por Ser16 a través de un T hacia la transición de A en la primera base del codón 17, que impide la formación incorrecta de la unión de disulfuro. La patente WO2005016371 revela una composición farmacéutica que comprende una variante del IFN - β - humano recombinante 1b mejorado con una mayor actividad específica.

Los tratamientos disponibles para el cáncer, las enfermedades infecciosas, la esclerosis múltiple y los trastornos autoinmunes asociados con el aumento de la expresión del IFN - α 2 son caros, efectivos sólo en un cierto porcentaje de pacientes y los efectos secundarios adversos son frecuentes. Para satisfacer una necesidad médica sigue habiendo procedimientos terapéuticos adecuados, seguros, fiables, eficaces y rentables.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se refiere a las realizaciones tal y como se definen en las reivindicaciones.

La presente invención presenta mutantes de IFN α 2 nuevo con una importante utilidad terapéutica. Las variantes de la divulgación han mejorado la especificidad como agonistas o antagonistas en comparación con el IFN - α 2 de tipo salvaje.

Por vez primera, la presente invención revela el hallazgo de un mutante de IFN - α 2 recombinante, que imita las propiedades de unión del IFN - β (SEC ID N° 3) y muestra una característica clave de la actividad del IFN - β diferencial. Esto incluye el aumento de la actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* y específica el descenso del receptor IFNAR2.

La presente invención se refiere a una molécula de ADN seleccionada del grupo formado por: la SEC ID N° 20, la SEC ID N° 21, la SEC ID N° 22 y la SEC ID N° 23.

Según un primer aspecto, la presente divulgación presenta un polipéptido de interferón α 2 (IFN - α 2) recombinante, un fragmento activo, análogo, derivado y variantes de los mismos, donde dicho polipéptido comprende una mutación seleccionada de al menos una sustitución de un aminoácido en residuos de los aminoácidos 57 - 89 y al menos una sustitución de un aminoácido de los residuos de aminoácidos C- terminal de 159 - 165, así como combinaciones de los mismos, donde dicho polipéptido ha mejorado con una actividad específica agonista o antagonista si se compara con el IFN - α 2 de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

Según algunas realizaciones, el polipéptido comprende al menos una mutación seleccionada del grupo formado por H57A (SEC ID N° 24), E58A (SEC ID N° 25), Q61S (SEC ID N° 26), H57Y (SEC ID N° 27), E58N (SEC ID N° 28), Q61S (SEC ID N° 29), y combinaciones de los mismos, donde dicho polipéptido ha mejorado la actividad específica agonista o antagonista si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

5 Según una forma de realización, la presente divulgación presenta un mutante triple H57A, E58A y Q61A (SEC ID N° 5), que posee una mejor actividad específica si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

10 Según otra forma de realización, la presente divulgación presenta un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A E Y89A, (SEC ID N° 6), que posee una actividad antagonista si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje.

15 Según una forma de realización, la presente divulgación presenta una proteína de IFN - $\alpha 2$ que comprende una sustitución del C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE, (SEC ID N° 7), que posee una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje.

20 Las mutaciones específicas de los mutantes de IFN - $\alpha 2$ de la invención, se encuentran cada uno en una posición diferente en la proteína, y por lo tanto pueden combinarse para producir efectos adicionales o incrementados.

25 Según una forma de realización, la presente divulgación presenta una variante de IFN - $\alpha 2$ que comprende una combinación del mutante triple H57A, E58A y Q61A y sustitución del C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE, (SEC ID N° 8), con una alta actividad específica.

30 Según otra forma de realización, la presente divulgación presenta una variante de IFN - $\alpha 2$ que comprende una combinación del mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A e Y89A y la sustitución del C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE, (SEC ID N° 9), con un aumento de la afinidad de unión a IFNAR2, aunque con una actividad biológica muy baja. Esta variante de IFN - $\alpha 2$ se revela ahora para actuar como un IFN antagonista bloqueando la actividad natural de los IFNs a través de sus receptores.

35 Según una forma de realización, la presente divulgación presenta un mutante triple H57M, E58D y Q61L (SEC ID N° 10), que posee una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

40 Según otra forma de realización, la presente divulgación presenta un mutante triple H57Y, E58N y Q61S (SEC ID N° 11), que posee una mejor actividad específica si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

45 Según otra forma de realización, la presente divulgación presenta una variante de IFN - $\alpha 2$ que comprende una combinación del mutante triple H57M, E58D y Q61L y una sustitución del C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE, (SEC ID N° 12), con una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

50 Según otra forma de realización, la presente divulgación presenta una variante de IFN - $\alpha 2$ que comprende una combinación del mutante triple H57Y, E58N y Q61S y una sustitución del C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE, (SEC ID N° 13), con una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

Según algunas realizaciones, la presente invención presenta mutantes de IFN - $\alpha 2$ pegilados con una mayor actividad incrementada.

55 Según otro aspecto, la presente invención presenta moléculas de ADN que codifican los polipéptidos de la invención. Según una realización de la invención, las moléculas de ADN comprenden una secuencia seleccionada de la SEC ID N° 20-23.

Según otro aspecto adicional, la presente invención presenta un vector que comprende una molécula de ADN de la invención, donde dicho vector es capaz de expresar un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mutante en una célula huésped procarionta o en una célula huésped eucariota.

60 Según otro aspecto, la presente invención presenta una célula huésped que comprende un vector de la invención.

65 Según otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un polipéptido de interferón - $\alpha 2$ (IFN - $\alpha 2$) recombinante, un fragmento activo, análogo, derivado y variante del mismo, donde dicho polipéptido comprende una mutación seleccionada de al menos una sustitución de un aminoácido en residuos de los aminoácidos 57 - 89 y al menos una sustitución de un aminoácido de los residuos de los aminoácidos C- terminal 159 - 165, así como combinaciones de los mismos, donde dicho

polipéptido ha mejorado la actividad específica agonista o antagonista si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2) que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Según otras realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende un polipéptido de interferón- $\alpha 2$ (IFN - $\alpha 2$) recombinante que tiene cualquiera de las SEC ID N° 10-13.

10 Según una realización de la invención, la composición farmacéutica comprende un polipéptido de interferón- $\alpha 2$ (IFN - $\alpha 2$) recombinante que tiene cualquiera de las SEC ID N° 10, 11, 12 y 13, donde dicho polipéptido ha mejorado la actividad agonista específica.

15 Según otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de interferón- $\alpha 2$ (IFN - $\alpha 2$) recombinante que contiene cualquiera de las SEC ID N° 6 y 9, fragmentos, análogos, derivados y variantes de los mismos, donde dicho polipéptido ha mejorado con la actividad específica antagonista.

20 Según otro aspecto, la presente divulgación presenta un procedimiento para el tratamiento o la prevención de un trastorno o enfermedad asociado con la modulación del IFN que comprende la administración de la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que necesite una cantidad terapéutica efectiva, donde dicho trastorno o enfermedad se selecciona del grupo formado por cáncer, enfermedad autoinmune y enfermedad infecciosa en el que dicha enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple (EM).

25 Según una realización de la invención, dicha enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple (EM). Según una realización de la invención en su forma preferente, dicha EM se selecciona del grupo formado por EM remitente-recidante, EM progresiva secundaria, EM progresiva primaria y EM progresiva de recaída.

Según algunas realizaciones de la invención, los mutantes del IFN - $\alpha 2$ que tienen cualquiera de las SEC ID N° 10, 11, 12 y 13 son útiles para el tratamiento o la prevención de la EM.

30 Según una realización de la invención, dicho cáncer se selecciona del grupo formado por leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, linfoma de no Hodgkins y melanoma.

35 Según otra realización, la presente divulgación presenta un procedimiento para inhibir el crecimiento de las células cancerígenas, exponiendo las células cancerígenas a una cantidad terapéuticamente eficaz de un mutante de IFN - $\alpha 2$ que tiene cualquiera de las SEC ID N° 5, 7, 8, 10, 11, 12 y 13, fragmentos, análogos y derivados de los mismos.

Según una realización de la invención dicha enfermedad infecciosa es la infección por virus de la hepatitis.

40 Según algunas realizaciones de la invención, dicha hepatitis se selecciona del grupo formado por hepatitis A, hepatitis B y hepatitis C.

45 Según otra realización de la invención, los mutantes del IFN - $\alpha 2$ que tiene cualquiera de las SEC ID N° 10, 11, 12 y 13 son útiles para el tratamiento o la prevención de la infección por virus de la hepatitis.

Según otra forma de realización, se describen procedimientos para el tratamiento o la profilaxis de los trastornos asociados con el aumento de la expresión del IFN - $\alpha 2$ que incluye de manera no limitante diabetes mellitas insulino dependiente (DMID), lupus eritematoso sistémico (LES) que comprende la administración a un sujeto que necesite un mutante de IFN - $\alpha 2$ que tenga en la SEC ID N° 6 y 9 fragmentos, análogos y derivados de los mismos.

50 Según otro aspecto, se presenta el empleo de los mutantes del IFN - $\alpha 2$, revelados para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de los trastornos o las enfermedades asociadas con la modulación del IFN.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 **LAS FIGURAS 1A-1C** muestran la inmovilización del dominio receptor-extracelular del interferón de Tipo I (IFNAR1 - EC) por la afinidad de la captura y la unión del IFN - $\alpha 2$. **La FIGURA 1A** muestra la curva de unión para la captura del IFNAR1 con mAb DB2 inmovilizado, seguido por reticulación con mAb AA3. **La FIGURA 1B** muestra el análisis de afinidad del estado estacionario. La unión de E58A (línea gris) y E96A (línea negra) del IFN - $\alpha 2$ al IFNAR1 inmovilizado en la superficie a diferentes concentraciones entre 0,25 y 4 μ M (veáanse los números en la figura). **La FIGURA 1C** muestra la reacción de disociación del IFN - $\alpha 2$, el IFN - β y el mutante triple H57A, E58A Y Q61A (SEC ID N° 5) del IFNAR1 - EC inmovilizado en la superficie en tiempo real. La velocidad de disociación está directamente relacionada con la afinidad de unión, con datos resumidos en las Tablas 1 y 3.

65 **LA FIGURA 2** muestra el análisis de la unión del IFNAR1 y el IFNAR2 al IFN - $\alpha 2$. Los interferones de Tipo I se alinean respecto al IFN - $\alpha 2$. Los residuos subrayados son aquellos que al mutar a Ala no cambian la unión a

cualquier receptor. Los signos de “+” y “-“ anteriores simbolizan si la mutación causó un aumento o disminución de la afinidad de unión del IFN - $\alpha 2$ sobre la mutación (véase la Tabla 1). El número superior simboliza si el cambio se debe a la unión al IFNAR1 (1) o al IFNAR2 (2). Los residuos C-terminales en el IFN - $\alpha 8$ se encuentran en negrita para marcar los cambios realizados en la SEC ID N° 7. Los residuos encuadrados son los relativos a las SEC ID N° 5-13.

LAS FIGURAS 3A-3B muestran el epítipo funcional para la unión del IFNAR1 en el IFN - $\alpha 2$. **LA FIGURA 3A** muestra la gráfica del cambio en la afinidad de unión de todas las proteínas mutantes analizadas por nosotros tanto para IFNAR1 como para IFNAR2. **LA FIGURA 3B** muestra una representación de la superficie de un modelo del complejo del IFN - $\alpha 2$ con IFNAR2 tal como se ha determinado anteriormente. Se muestran en números los residuos en los que la mutación anterior cambia la unión del IFNAR1. Están subrayados los residuos en los que la mutación anterior aumenta la afinidad de unión por > 2 (57, 58, 61). Esta imagen se compone de PyMol.

LAS FIGURAS 4A-4C muestran una dependencia de concentración de la respuesta antiviral y antiproliferativa de los interferones en las células WISH. **LA FIGURA 4A** muestra un conjunto de datos sin tratar de la respuesta antiproliferativa tras la administración de una disolución serial del interferón en un rango de 250 nM-0,48 pM de IFN - $\alpha 2$ y 125 nM-0,24 pM y IFN - β . **LAS FIGURAS 4B** y **4C** muestran las lecturas de densitometría de tres antiproliferativos independientes (**4B**) y experimentos antivirales (**4C**) que también inducen el mutante triple H57A, E58A, Q61A, (SEC ID N° 5). Los datos son de 6 muestras repetidas incluyendo el error estándar. Se ajustó la curva a una ecuación de respuesta de una dosis y representa el mejor ajuste para los datos combinados.

LAS FIGURAS 5A-5B muestran actividades biológicas de los mutantes de interferón. **LA FIGURA 5A** muestra la actividad antiviral relativa (de ts) marcada contra la actividad antiproliferativa relativa de 21 mutantes individuales del IFN - $\alpha 2$, del mutante triple H57A, E58A, Q61A, (SEC ID N° 5), del mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A E Y89A, (SEC ID N° 6), (SEC ID N° 7), del mutante triple H57Y, E58N, Q61S, (SEC ID N° 11) y del IFN - β . **LA FIGURA 5B** muestra actividades antiproliferativas y antivirales relativas de las mismas proteínas marcadas contra su afinidad de unión relativa para el IFNAR1 - EC. Todos los datos pertenecen a las Tablas 1 - 4. La línea recta representa una relación teórica entre la actividad biológica y la afinidad. Los puntos por encima de la línea representan los mutantes en los que el cambio en la actividad biológica (antiviral o antiproliferativa) es más débil que sus cambios en la afinidad y los puntos por debajo de la línea representan lo contrario.

LAS FIGURAS 6A-6B muestran el efecto del interferón en la expresión génica controlada por experimentos de microarrays de oligonucleótidos moteados. Se testaron cuatro tratamientos diferentes de interferón de 16 horas de duración: 0,3 nM (1.000 unidades) de IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje, 3 nM (10.000 unidades) de IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje, 0,3 nM de HEQ (SEC ID N° 5) y 0,15 nM de IFN - β (1.000 unidades). Cada estado se representa con un tratamiento de IFN contra uno sin tratamiento en duplicados de microarrays de dye-swap. Además, cuatro réplicas de experimentos de microarrays consistentes en el tratamiento contra el no tratamiento de otra muestra representan el tratamiento sin IFN como control. **LA FIGURA 6A** muestra los niveles de expresión relativa (sin tratamiento) de 395 genes marcados en orden ascendente según los cambios. **LA FIGURA 6B** muestra los niveles de expresión marcados relativos a los niveles de expresión tras la adición de 0,15 nM del IFN - β . La única excepción es para el nivel de expresión del control sin tratar (puntos negros), en el que se marca contra un segundo conjunto de control para evaluar el nivel aleatorio de fluctuación. **LA FIGURA 6C** muestra el análisis de conglomerado de los genes inducidos del interferón para los cuatro tratamientos. Los perfiles de expresión génica del IFN - β y HEQ (SEC ID N° 5) se agrupan juntos con una distancia muy corta entre ellos.

El perfil de expresión de las células tratadas con 3 nM del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje se agrupa rápidamente, mientras que el perfil de la expresión génica de 0,3 nM del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje lo hace más lentamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se presentan aquí mutantes de IFN - $\alpha 2$ y fragmentos activos, análogos, derivados y variantes de los mismos que han mejorado la actividad agonista o antagonista si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2). Los mutantes de la invención presentan una utilidad terapéutica mejorada que puede incluir al menos una ventaja seleccionada de una especificidad o selectividad mejorada, una duración mejorada de la acción, estabilidad mejorada y un menor número de efectos adversos.

La presente divulgación presenta, además composiciones farmacéuticas que comprenden mutantes del FN- $\alpha 2$ útiles para el tratamiento o la prevención del cáncer, la esclerosis múltiple, enfermedades infecciosas y trastornos asociados con el aumento de la expresión del IFN - $\alpha 2$ tales como la diabetes mellitas insulino dependiente (DMID), y el lupus eritematoso sistémico (LES).

Definiciones

El término interferón (IFN) o interferones (IFNs) se refiere a la familia de las proteínas secretoras que son citocinas con actividades antivirales, antiprotzoarias, inmunomoduladoras y reguladoras del crecimiento celular. Los IFNs se clasificaron originalmente por fuentes: leucocitos de IFN- $\alpha 1$ (SEC ID N° 1) e IFN - $\alpha 2$ (SEC ID N° 2),

fibroblastos de IFN - β (SEC ID N° 3) y células inmunes de IFN- γ (SEC ID N° 4). Es preciso hacer mención a los IFNs alfa, beta y gamma. El interferón alfa es el tipo principal de interferón producido por los glóbulos blancos.

5 Los términos “análogo”, “fragmento”, “derivado” y “variante”, cuando se refieren a los polipéptidos del IFN - $\alpha 2$ mejorado descritos en este documento significan análogos, fragmentos, derivados y variantes de los polipéptidos del IFN - $\alpha 2$ mejorado que mantienen la actividad funcional sustancialmente similar o sustancialmente la misma función o actividad biológica que los polipéptidos del IFN - $\alpha 2$ mejorado, tal y como se describe en este documento.

10 Un “análogo” incluye un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado donde al menos se sustituye un aminoácido por otro aminoácido para producir un análogo activo de un polipéptido de la invención con actividad incrementada, estabilidad o vida media más larga si se compara con los polipéptidos aquí citados.

15 Un “fragmento” es una parte de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado que retiene la actividad funcional sustancialmente similar o sustancialmente la misma función o actividad biológica que los polipéptidos del IFN - $\alpha 2$ mejorado, como se muestra en los ensayos *in vitro* descritos a continuación en la presente.

20 Un “derivado” incluye todas las modificaciones de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado que conserva sustancialmente las funciones aquí descritas e incluye una estructura adicional y una función auxiliar, por ejemplo , polipéptidos pegilados con mayor vida media.

Una “variante” incluye polipéptidos que poseen una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de los polipéptidos del IFN - $\alpha 2$ mutante que retiene la actividad funcional sustancialmente similar o una actividad funcional incrementada si se compara con los polipéptidos del IFN - $\alpha 2$ mutante original.

25 La “actividad funcional sustancialmente similar” y sustancialmente la misma función biológica o actividad” significa que el grado de actividad biológica es del 50 % al 100 % o más, preferiblemente del 80 % al 100 % o más, y más preferiblemente del 90 % al 100 % o más, de la actividad biológica demostrada por el polipéptido al que se está comparando cuando la actividad biológica de cada polipéptido se determinó por el mismo ensayo o método.

30 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 una sustitución de aminoácido conservadora o idéntica. Las sustituciones conservadoras incluyen aquellas descritas en Dayhoff, M. O., ed., The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC. (1978), and in Argos, P. (1989) EMBO J. (: 779 - 785. Por ejemplo, los aminoácidos pertenecientes a uno de los siguientes grupos que representan cambios o sustituciones conservadoras: Ala:-Pro, Gly, Gln, Asn, Ser; Thr:-Cys, Ser, Tyr; Thr:-Val, Ile, Leu, Met, Ala; Phe:-Lys, Arg; His:-Phe, Tyr, Trp, His y -Asp, Glu.

40 “Actividad específica” tal y como se usa en la presente con referencia a un mutante de IFN - $\alpha 2$ de la presente invención significa una actividad o función biológica de un IFN - $\alpha 2$. Las actividades o funciones biológicas del IFN - $\alpha 2$ son muy conocidas en la disciplina e incluyen de manera no limitante una actividad antiproliferativa. Tal actividad específica puede detectarse y medirse utilizando los procedimientos aquí descritos o utilizando cualquier otro procedimiento conocido en la disciplina.

45 “Actividad específica mejorada” tal y como se usa en la presente significa que la actividad específica o la actividad antagonista de la composición del IFN - $\alpha 2$ es mayor que la de la referencia de la composición del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje. Puede analizarse la actividad específica de una composición del IFN - $\alpha 2$ de la presente invención si se compara con la actividad específica de la referencia de la composición del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje utilizando un procedimiento para detectar y/o medir la actividad específica de un IFN - $\alpha 2$, por ejemplo, como se describe en la presente o tal y como se conoce en la disciplina.

50 “Composición del IFN - $\alpha 2$ ” se refiere a un polipéptido de IFN - $\alpha 2$, fragmento, análogo, derivado o variante de los mismos o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un polipéptido de IFN - $\alpha 2$, un fragmento, un análogo, un derivado o una variante del mismo.

55 El término “proteínas recombinantes o polipéptidos” se refieren a las proteínas o polipéptidos producidos por técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, producidas a partir de células procariontas o eucariotas, incluyendo por ejemplo, las de microbios o mamíferos, transformadas por una expresión de ADN recombinante exógena creada para codificar la proteína o el polipéptido deseado. Las proteínas o los polipéptidos expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos normalmente estarán libres de glicano. Las proteínas o los polipéptidos expresados en levaduras pueden poseer un patrón de glicosilación diferente al expresado en las células de mamíferos.

60 Un “vector de expresión” tal y como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de replicar y expresar un gen de interés cuando se transforme, se transfecte o se transluzca a una célula huésped. Los vectores de expresión comprenden uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si se desea, proporcionar la amplificación en el huésped.

65

Los marcadores seleccionables induyen, por ejemplo, secuencias que confieren marcadores de resistencia de antibióticos que pueden utilizarse para obtener transformantes de éxito por selección, como la ampicilina, tetraciclina y secuencias de resistencia a la kanamicina, o para suministrar nutrientes críticos no disponibles en los medios complejos. Los vectores de expresión adecuados pueden ser derivados de plásmidos, por ejemplo, de pBR322 o varios plásmidos de pUC disponibles comercialmente. Otros vectores de expresión pueden ser derivados de bacteriófago, fagemido o vectores de expresión de cósmidos, todos ellos descritos en las secciones 1.12-1.20 de Sambrook et al.; (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edn., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Los plásmidos aislados y los fragmentos de ADN se adhieren, se adaptan y se unen en un orden específico para generar los vectores deseados como bien se conoce en la disciplina (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *ibid*).

El término proteínas o polipéptidos “nativo”, “de origen natural” o “tipo salvaje” (ts) se refieren a las proteínas o polipéptidos recuperados de una fuente de origen natural. El término “IFN nativo” o “IFN de tipo salvaje” podría incluir IFN nativo o de tipo salvaje y podría incluir modificaciones post-transcripcionales de IFN, que incluyen pero de manera no limitante acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lapidación, acilación y segmentación.

El término “vector o plásmido de expresión recombinante” es un vector de ADN de replicación o un constructo de plásmido utilizado para amplificar o expresar el ADN que codifica las proteínas o los polipéptidos de la presente invención. Un vector o plásmido de expresión contiene secuencias de control de ADN y una secuencia de codificación. Las secuencias de control de ADN incluyen secuencias promotoras, áreas de unión a ribosomas, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de transcripción, dominios reguladores corriente arriba y potenciadores. Los sistemas de expresión recombinante definidos en la presente, expresarán las proteínas o los polipéptidos de la invención tras la inducción de los elementos reguladores.

El término “células huésped transformadas” hace referencia a las células que han sido transformadas y transfectadas con ADN exógeno. Se puede o no integrar (por ejemplo enlazado covalentemente) ADN exógeno al ADN cromosómico constituyendo el genoma de la célula huésped. En procariontes y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno puede mantenerse en un elemento episomal, como un plásmido, o integrarse de manera estable al ADN cromosómico. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada de forma estable es aquella en la que el ADN exógeno se ha integrado al cromosoma. Se demuestra esta estabilidad por la capacidad de las líneas celulares eucariotas o clones para producir mediante una replicación de una población de células hijas que contienen el ADN exógeno.

El término “cebador” tal y como se utiliza en la presente, hace referencia a un oligonucleótido, tanto si se produce de forma natural, como en una digestión de restricción purificada, como de forma sintética, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de un cebador, complementario a la hebra de ácido nucleico, es decir, en presencia de los nucleótidos y un agente inductor como la polimerasa de ADN y una temperatura y Ph adecuados. El cebador puede ser bien monocatenario o bicatenario y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor.

“Cantidad terapéutica efectiva” hace referencia a la cantidad de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado que, cuando se suministra a un sujeto con las mismas necesidades, es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, la esclerosis múltiple remitente recidivante (EM), el cáncer, las enfermedades infecciosas o los trastornos asociados al aumento de la expresión del IFN - $\alpha 2$, así como la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y el lupus eritematoso sistémico (LES).

El término “sujeto” hace referencia a los sujetos humanos y a los sujetos no humanos.

El término “cáncer” incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células transformadas en malignas, tejidos u órganos, independientemente del tipo histopatológico o fase de invasión. Algunos ejemplos de cáncer incluyen de manera no limitante los tumores sólidos y leucemias: apudoma, coristoma, branquioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, carcinoma (por ejemplo de Walker, células basales, basoescamoso, Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, de pulmón de células no pequeñas, células de avena, papilar, bronquial, broncogénico, células escamosas y células de transición), trastornos histiocítico, leucemia (por ejemplo, células B, células mixtas, células nulas, células T, crónica de células T, asociado a HTLV-II, linfocítica aguda, linfocítica crónica, mastocitos y mieloides) histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, inmunoproliferativa pequeña, linfoma de no Hodgkin, plasmocitoma, reticuloendoteliosis, melanoma, condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, tumores de células gigantes, histiocitoma, lipoma, liposarcoma, mesoteloma, mixoma, mixosarcoma, osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sinovioma, adenofibroma, adenolinfoma, carcinosarcoma, cordoma, craneofaringioma, disgeminoma, hamartoma, mesenquima, mesonefoma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, timoma, tumor trofoblástico, adenocarcinoma, adenoma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, tumor de células de granulosa, ginandroblastoma, hematoma, hidradenoma, tumor de las células islotas, tumor de células de Leydig, papiloma, tumor de células de Sertoli, tumor de células teca, leiomioma, leiomiocarcinoma, mioblastoma, miosarcoma, rhabdomioma, rhabdomyosarcoma, ependimoma, ganglioneuroma, glioma,

meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuriepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma no cromafín, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia, angioma esderosante, angiomatosis, glomangioma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, condrosarcoma, cistosarcoma, filoides, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leimiosarcoma, leucosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, miosarcoma, mixosarcoma, carcinoma de ovarios, rabdomiosarcoma, sarcoma (de Erwing, experimental, Kaposi, mastocitos), neurofibromatosis, displasia cervical y otras enfermedades en las que las células llegan a inmortalizarse o transformarse.

“Tratamiento de la EM” tal y como se utiliza en la presente cubre el tratamiento del estado de la enfermedad en un sujeto en el que el estado de la enfermedad se caracteriza por síntomas asociados a la EM, como la debilidad, entumecimiento, temblores, pérdida de visión, dolor, parálisis, pérdida del equilibrio, disfunción intestinal y de la vejiga, cambios cognitivos (síntomas primarios), repetidas infecciones del tracto urinario, debilidad por desuso, mala alineación corporal y control del tronco, desequilibrio muscular, disminución de la densidad ósea, insuficiencia respiratoria, llagas (síntomas secundarios) y depresión (síntomas terciarios) e incluye: (i) inhibición de la enfermedad, es decir; detener el desarrollo o (ii) aliviar la enfermedad, es decir; provocar la regresión de la enfermedad.

El término “infección por virus de la hepatitis” hace referencia a la infección con uno o más virus de la hepatitis A, B, C, D o E, siendo de particular interés la infección viral de la hepatitis por transmisión sanguínea.

Tal y como se utiliza en la presente, el término “fibrosis hepática”, se utiliza en la presente de forma intercambiable con la “fibrosis del hígado”, que hace referencia al crecimiento del tejido cicatricial en el hígado que puede ocurrir en el contexto de una infección crónica de hepatitis.

El término “mutantes de IFN - $\alpha 2$ pegilados” tal y como se utiliza en la presente, significa conjugados modificados con polietilenglicol de mutantes de IFN - $\alpha 2$. En la forma preferente de los conjugados mutantes de IFN - $\alpha 2$ de polietilenglicol se conjugan reversiblemente para convertirse lentamente en medicamentos para enfermedades fisiológicas, como las preparadas según los procedimientos descritos en la patente WO2004089280. Pueden prepararse otros conjugados de mutante de IFN - $\alpha 2$ por acoplamiento de un mutante de IFN - $\alpha 2$ a un polímero soluble en agua. Una lista no limitante de estos polímeros incluye otros homopolímeros de óxido de polialquileno como polipropilenglicoles, polioxietilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloque de los mismos. Como alternativa a los polímeros a base óxido de polialquileno, pueden utilizarse materiales eficazmente sin antigénicos como el dextrano, las polivinilpirrolidonas, poliácridamidas, alcoholes de polivinilo y polímeros a base de carbono y similares. Se describen estos conjugados en la patente de US N° 4.766.106 y en la patente de US N° 4.917.888.

Tal y como se define en la presente, un “microarray” se refiere a una pluralidad de moléculas de ácido nucleico aisladas o sondas de oligonucleótidos unidas a un soporte donde cada una de las moléculas de ácido nucleico o las sondas de oligonucleótidos se unen a un soporte en una única región preseleccionada. El término “ácido nucleico” es intercambiable con el término “polinucleótido”. El término “polinucleótido” se refiere a una cadena de nucleótidos. Preferiblemente, la cadena de 20 a 10.000 nucleótidos, más preferiblemente de 150 a 3.500 nucleótidos.

El término “sonda” se refiere a la secuencia de polinucleótidos capaz de hibridar con un transcrito génico o un complemento de la misma para formar un complejo transcrito de sonda/génico polinucleótido.

El término “gen” incluye una región que puede transcribirse en ARN, la invención contempla la detección del ARN o equivalentes del mismo, por ejemplo, ADNc y ARNc. Un gen descrito en la presente incluye de manera no limitante genes específicos para participar en un proceso biológico particular y/o indicativo de un proceso biológico, como apoptosis, diferenciación, respuesta del estrés, envejecimiento, proliferación, etc, mecanismo de genes celulares, por ejemplo, ciclo celular, transducción de señales, metabolismo de compuestos tóxicos y similares, enfermedad de genes asociados, por ejemplo, genes implicados en el cáncer, esclerosis múltiple, infección y similares. Por ejemplo, el gen puede ser un oncogén cuya expresión en una célula induce a una célula a convertirse de una célula normal a una célula tumoral. Otros ejemplos de genes incluyen de manera no limitante los genes de citocinas, genes priones, genes que codifican moléculas que provocan angiogénesis, genes que codifican las moléculas de adhesión, genes que codifican los receptores de la superficie celular, genes que codifican las proteínas implicadas en procesos metastásicos y/o invasivos, genes de las proteasas así como el de las moléculas que regulan la apoptosis y el ciclo celular.

Según la presente divulgación, se puede determinar el nivel de un transcrito génico midiendo el nivel del transcrito génico, por ejemplo, con ARN o empleando procedimientos semicuantitativos como la hibridación de microarrays o procedimientos cuantitativos como la PCR cuantitativa.

Tal y como se utiliza en la presente, el término “regulación de la expresión y/o actividad” se refiere generalmente a cualquier proceso en el que la función controla o modula la cantidad o actividad (funcionalidad) de

un componente celular. La regulación estática mantiene la expresión y/o actividad en algún nivel dado. El aumento se refiere al incremento relativo en la expresión y/o actividad. En consecuencia, el descenso se refiere a la bajada relativa en la expresión y/o actividad. El descenso es sinónimo de la inhibición de la actividad del componente celular dado.

5

Características de Polipéptidos de IFN - α 2 Mejorado

Se introdujeron tres mutaciones individuales (H57A, E58A, Q61A) (SEC ID N°5) en el IFN - α 2 que aumentaron específicamente su afinidad de unión hacia el receptor IFNAR1 unas 30 veces en comparación con la proteína de tipo salvaje (SEC ID N° 2). La afinidad de la proteína del IFN - α 2 mutante utilizada en la presente, designa HEQ, similar a la medida para el IFN - β (Tabla 3), que se encuentra muy por encima de cualquier otro subtipo de interferón. La evaluación de la actividad biológica de HEQ muestra claramente que ganó características muy similares del IFN - β (SEC ID N° 3). Por lo tanto, HEQ duplica su potencia antiviral y multiplica por 25 su potencia antiproliferativa relativa al IFN - α 2 de tipo salvaje (SEC ID N° 2) (Tabla 4).

15

Se introdujeron dos conjuntos adicionales de mutaciones en las mismas posiciones del IFN - α 2 y del HEQ: H57M, E58D, Q61L, denominados en la presente como MDL (SEC ID N° 10), y H57Y, E58N, Q61S, denominados en la presente como YNS (SEC ID N° 11). La actividad antiviral de tipo salvaje se triplicó en ambos casos (Tabla 4). Sin embargo, su actividad antiproliferativa es mayor que la de HEQ del IFN - β . Para MDL, la actividad es 40 veces mayor comparada con el tipo salvaje, y para YNS es 160 veces mayor en las células WISH y 70 veces mayor en las células MDA231, que son de 3 - 7 veces mayores que las medidas para el IFN - β (SEC ID N° 3).

20

Se controló el perfil de la transcripción génica del HEQ (SEC ID N° 5) mediante los experimentos de microarrays de oligonucleótidos. La activación génica de HEQ es mucho mayor que la del IFN - α 2 en la misma concentración de proteína, similar a la activación génica registrada para el IFN - β (SEC ID N° 3). YNS o HEQ podrían ser potencialmente medicamentos más efectivos en el tratamiento de la enfermedad si se compara tanto al IFN - α 2 de tipo salvaje como al IFN - β . La ventaja de YNS y HEQ sobre el IFN - α 2 de tipo salvaje se encuentra en su mayor especificidad antiproliferativa que puede ayudar a reducir los efectos secundarios y al tratamiento del cáncer o en la esclerosis múltiple. La ventaja de YNS es que posee un mayor efecto antiproliferativo comparado con el IFN - β , en particular las medidas en las células cancerígenas de mama humanas, MDA231.

25

30

Se describe también un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6), como se describe en la presente, designada como NLYY que tiene reducida 1.000 veces la actividad antiproliferativa y reducida 100 veces la actividad antiviral comparada con la proteína de tipo salvaje aunque aún se une al IFNAR2 en afinidad de tipo salvaje (Tabla 2).

35

La presente invención presenta una proteína de IFN - α 2 que comprende una sustitución de C-terminal ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 7), tal y como se describe en la presente y designada como el extremo - α 8. El mutante extremo - α 8 se creó genéticamente para tener el extremo del interferón α 8 con el fin de optimizar la energía de unión electrostática entre el IFN - α 2 y su receptor IFNAR2. Las medidas de unión han demostrado que el mutante extremo - α 8 tiene una afinidad de unión al IFNAR2 18 veces mayor en comparación con el de tipo salvaje (Tabla 2). La actividad antiviral del mutante extremo - α 8 es 3 veces mayor y la actividad antiproliferativa es 10 veces mayor en comparación a la de tipo salvaje (Tabla 2).

40

45

Las mutaciones específicas de los tres mutantes del IFN - α 2 de la invención se encuentran en una posición diferente en la proteína y, por lo tanto, pueden combinarse al rendimiento adicional o a los efectos incrementados. La presente invención presenta variantes que comprenden una combinación del mutante triple MDL (SEC ID N° 10) o YNS (SEC ID N° 11), y la sustitución de C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N°7). Estas variantes (SEC ID N° 12 y 13), pueden ser más eficaces en el tratamiento contra el cáncer, específicamente como el aumento en la actividad antiproliferativa. Por otra parte, su potencia de unión mayor puede superar el problema de los receptores de descenso en las células cancerígenas. Ya que HEQ se compone de tres mutaciones de un solo punto a Ala, y el mutante del extremo - α 8 comprende un reemplazamiento de C-terminal del IFN - α 2 con C-terminal del IFN - α 8 nativo, la posibilidad de respuesta específica inmunogénica es nima.

50

55

Además, se describe una variante que comprende una combinación de un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A y la sustitución de C-terminal de ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 9), con una afinidad de unión aumentada en IFNAR2 aunque con una actividad biológica muy baja. Esta variante del IFN - α 2 es un antagonista del IFN que bloquea la actividad natural de los IFNs a través de los receptores.

60

65

Las composiciones de IFN - α 2 mejorado de la presente divulgación comprenden polipéptidos de IFN - α 2 mutante o fragmentos, análogos, derivados y variantes de los mismos, que tienen al menos una actividad específica de 2, preferiblemente al menos de 10, más preferiblemente al menos de 100 e incluso más preferiblemente de 1.000 veces mayor que en la de la referencia de la composición del IFN - α 2 de tipo salvaje. En algunas realizaciones, las composiciones del IFN - α 2 de la presente divulgación tienen una actividad antagonista con el IFN - α 2 de tipo salvaje.

Los antagonistas de la divulgación

Se define un antagonista de IFN- α como cualquier sustancia capaz de interferir con un actividad biológica del IFN - α *in vivo*. No es necesario que el antagonista neutralice completamente la actividad del IFN - α , sino que lo haga sólo en un grado suficiente para ejercer una actividad terapéutica DMID o LES *in vivo*. El IFN - α es conocido por poseer una pluralidad de actividades biológicas. Los antagonistas utilizados en la presente se reducirán, inhibirán o neutralizarán en una o más de estas actividades. El antagonista interferirá con al menos (y preferiblemente todas) una actividad antiviral, antiproliferativa o inmunomoduladora del IFN - α .

Generalmente se seleccionan los antagonistas entre varias categorías: una foma soluble del receptor interferón alfa, anticuerpos del receptor del interferón antialfa que bloquean al interferón alfa de la unión o la interacción correcta con su receptor, anticuerpos capaces de unir y neutralizar al interferón alfa por sí mismo y a los polipéptidos sin interferón que compiten con el interferón alfa por las áreas de unión del receptor y que por sí mismo demuestra una actividad sustancial del interferón alfa. Son mutantes del IFN- α los antagonistas de la presente divulgación que antagonizan la actividad del IFN - α y el IFN - β .

Mutagénesis de IFN - α 2

Pueden probarse experimentalmente los efectos de la alteración de aminoácidos en posiciones específicas mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos y testar los polipéptidos del IFN - α 2 alterado para la actividad biológica utilizando los ensayos descritos en la presente. Puede utilizarse cualquier técnica conocida en la disciplina para la mutagénesis incluyendo de manera no limitante la mutagénesis química, la mutagénesis dirigida *in vitro*, utilizando por ejemplo, el Kit de QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), etc. Son particularmente adecuadas para este enfoque las técnicas como la mutagénesis por barrido de alanina.

Ácidos nucleicos

La presente invención presenta, además, moléculas de ácido nucleico que codifican a los polipéptidos de IFN - α 2 mejorado de la invención.

Puede producirse una molécula de ácido nucleico utilizando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química. Las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias de ácido nucleico natural y homólogos de los mismos, que comprenden de manera no limitante las variantes alélicas naturales y las secuencias de ácido nucleico modificado en las que se han introducido, eliminado, sustituido y/o invertido los nucleótidos, de tal manera que tales modificaciones no interfieran sustancialmente con la habilidad de la molécula del ácido nucleico para codificar los polipéptidos del IFN - α 2 recombinante de la presente invención.

Puede deducirse una secuencia polinucleótida u oligonucleótida a partir de un código genético de una proteína, sin embargo, debe tenerse en cuenta la degeneración del código y las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente, que incluyen también secuencias que se degeneran como resultado del código genético donde dichas secuencias pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" tal y como se utilizan en la presente se refieren a un oligonucleótido, polinucleótido o nucleótido y fragmentos o partes de los mismos, y al ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y representa la hebra sentido o la hebra antisentido. Debe entenderse también el término que incluye como equivalentes análogos de ARN o ADN hechos a partir de análogos nucleótidos y aplicables a la realización descrita.

El término "oligonucleótido" se refiere a la secuencia de ácido nucleico de 6 nucleótidos a 60 nucleótidos, preferiblemente de 15 a 30 nucleótidos, y más preferiblemente de 20 a 25 nucleótidos, que pueden utilizarse en la amplificación por PCR o en un ensayo de hibridación o un microarray. Como se utiliza en la presente, un oligonucleótido equivale sustancialmente a términos como se definen comúnmente en la disciplina "amplímeros", "cebadores", "oligómeros" y "sondas".

Como se utiliza en la presente, son condiciones altamente rigurosas aquellas que son tolerantes a una divergencia de secuencia de hasta aproximadamente el 5 % al 25 %, preferiblemente del 5 % al 15 %. Entre los ejemplos no limitantes, los ejemplos de condiciones altamente rigurosas (- 10° C por debajo de la T_m calculada del híbrido) se utiliza una solución de lavado de 0,1 X SSC (solución citrato-salina estándar) y 0,5 % de SDS a la T_i apropiada (temperatura de incubación) por debajo de la T_m calculada del híbrido. La rigurosidad final de las condiciones se debe principalmente a las condiciones de lavado, en particular si son utilizadas las condiciones de hibridación en aquellas que permiten híbridos menos estables para formar los híbridos estables. Una condición de hibridación común que puede utilizarse con las estrictas condiciones de lavado a condiciones de lavado moderadas descritas anteriormente, es la hibridación en una solución de 6 X SSC (o 6 X SSPE), reactivo de Denhardt de 5 X, 0,5 % de SDS, 100 μ g / ml desnaturalizado, ADN de esperma de salmón fragmentado en una T_i apropiada. (Véase

para condiciones de alta rigurosidad adecuadas, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edition, Cold Spring Harbor Press (1989)

5 Las condiciones de rigurosidad son una función de la temperatura utilizada en el experimento de hibridación y lavados, la molaridad de los cationes monovalentes en la solución de hibridación y en la(s) solución(es) de lavado y el porcentaje de formamida en la solución de hibridación. En general, se ve afectada la sensibilidad por hibridación con sonda por la cantidad y actividad específica de la sonda, la cantidad del ácido nucleico diana, la detectabilidad de la etiqueta, la proporción de hibridación y la duración de la hibridación. Se maximiza la proporción de hibridación en la T_i unos $20^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$ por debajo de la T_m para los híbridos de ADN-ADN y unos $10^\circ\text{C} - 15^\circ\text{C}$ por debajo de la T_m para los híbridos de ADN-ARN. Se maximiza también por fuerza iónica de Na^+ 1,5M. La proporción es directamente proporcional a la longitud del dúplex e inversamente proporcional al grado de mal apareamiento.

15 Es quizás la especificidad en la hibridación, una función de la diferencia en la estabilidad entre el híbrido deseado y los híbridos "fondo". La estabilidad del híbrido es una función de la longitud del dúplex, la composición base, la fuerza iónica, el mal apareamiento y los agentes desestabilizadores (si los hay). Puede estimarse la T_m de un híbrido perfecto para híbridos de ADN:ADN utilizando la ecuación de Meinkoth et al., (*Anal Biochem.* 1984; 138(2):267 - 84).

20 Expresión y Purificación de Polipéptidos de IFN - α_2 Mejorado

Hay varias formas de expresar y purificar el IFN - α_2 humano recombinante en una bacteria, en particular en *E. coli* para obtener polipéptidos de IFN - α_2 que presentan una actividad antagonista o agonista mejorada. Pueden utilizarse conocidos procedimientos para expresar genes clonados en una bacteria. Para obtener una expresión de alto nivel de un gen eucariota donado en un sistema procarionta, es preferible construir vectores de expresión que contengan un promotor fuerte para una transcripción de ARNm directo.

30 Ejemplos de regiones reguladoras adecuadas para este propósito son el promotor y la región operadora de *E. coli* del gen beta-glucosidasa, la vía de biosíntesis de triptófano de *E. coli* o el promotor de la izquierda del fago A. Es útil también, la inclusión de marcadores de selección en los plásmidos de ADN transformados en *E. coli*. Ejemplos de tales marcadores incluyen los genes que especifican resistencia a la ampicilina, a la tetraciclina o al cloranfenicol. Las modificaciones post-translationales, como la glicosilación, no se producen en el sistema de expresión *E. coli* de las células procariontas. Además, las proteínas con patrones de disulfuro complejos pueden ser mal plegadas cuando se expresa en *E. coli*. Con el sistema procarionta, la proteína expresada está presente en el citoplasma de la célula en una forma insoluble, en la inclusión llamados cuerpos, que se encuentran en la fracción soluble después de que se hayan lisado las células, o se dirige al periplasma por la adición de secuencias de señales de secreción apropiadas. Si la proteína expresada se encuentra en un cuerpo de inclusión insoluble, se requiere generalmente la solubilización y posterior repliegue de los cuerpos de inclusión.

40 Son conocidos por los expertos en la disciplina muchos vectores de expresión procariontas y están disponibles comercialmente, como el pKK223 - 3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pKK233 - 2 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) y pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, USA). Los promotores comúnmente utilizados en sistemas de expresión microbianos recombinantes inducen beta-lactamasa (penicilinas) y un sistema promotor de lactosa (Chang, A. C. et al. 1978, *Nature* 275:617 - 624). El sistema promotor de triptófano (*trp*) 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 fago lambda p_L y el represor temoinducible (Bernard et al., 1979, *Gene* 5:59 - 76).

50 Actualmente se utilizó el siguiente protocolo: se donó el gen que codifica al IFN - α_2 en un vector de expresión de dos cistrones basado en el plásmido pT7T3-18U al que se añadió un segundo cistrón secuencia arriba del codón de partida. El segundo cistrón es de los 9 primeros aminoácidos del gen *lpp* 5' que incluye su área flanqueada de SD por las áreas de restricción de XbaI y NdeI. La razón para la inserción de un segundo cistrón fue para mejorar el rendimiento de la expresión de la proteína heteróloga. Además, para mejorar el nivel de expresión, se transforman los codones para los primeros 23 aminoácidos en: TGT GAT CTG CCG CAG ACT CAC TCT CTG GGT TCT CGT CGT ACT CTG ATG CTG CTG CAG ATG CGT CGT (SEC ID N° 14). Se expresan en células BL21 las proteínas durante la noche en medio rico. Se encuentra en los cuerpos de inclusión el IFN - α_2 , que se disuelven en urea 8 M que contiene 5 nM DTT. Se repliega el IFN - α_2 por una dilución de 20 veces durante la noche. Se realiza la purificación de la proteína utilizando metodologías estándares. Los rendimientos típicos de las proteínas fueron de 10 mg/L de cultivo celular. El IFN - α_2 se mueve como una única banda de 18 kDa en SDS-PAGE.

60 Análogos, Fragmentos, Derivados y Variantes de Polipéptidos de IFN - α_2 Mejorado

Puede ser un análogo, fragmento, derivado o variante de polipéptidos de IFN - α_2 mejorado: (i) uno en el que se sustituyen uno o más de los residuos aminoácidos con residuo de aminoácido conservado o no conservado; o (ii) uno en el que se incluye en un grupo de sustitución uno o más residuos de aminoácidos; o (iii) uno en el que se fusiona con otro componente el polipéptido de IFN - α_2 mejorado, como un compuesto para aumentar la vida media

del polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado (por ejemplo polietilenglicol); o (iv) uno en el que se fusiona al polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado maduro como líder o secuencia secretora o una secuencia empleada para la purificación del polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado maduro; o (v) uno en el que se fusiona con un polipéptido más grande la secuencia de polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado, es decir; albúmina humana, un anticuerpo o Fc para aumentar la duración del efecto. A partir de las enseñanzas mostradas en la presente, se considera que están dentro del alcance de los expertos en la disciplina dichos análogos, fragmentos, derivados y variantes. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que se sustituye el residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que posee una cadena lateral similar. Se han definido en la disciplina las familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). No se podrían hacerse sustituciones no conservadoras para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos residentes en un dominio de proteína conservada. Los fragmentos o partes biológicamente activas incluyen fragmentos de polipéptidos adecuados para uso como medicamento, como un reactivo de investigación y similares. Los fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares a o derivados de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado y presenta al menos una actividad de este polipéptido, pero incluyen menos aminoácidos que los polipéptidos de longitud completa descrita en la presente. Típicamente, las partes biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad del polipéptido. Dichas partes biológicamente activas se pueden preparar sintéticamente o mediante técnicas recombinantes y pueden ser evaluadas para una o más actividades funcionales de un polipéptido de la presente invención por medios descritos en la presente y/o conocidos en la disciplina.

En la forma preferente, los derivados incluyen polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado fusionados con otro compuesto como un compuesto para incrementar la vida media del polipéptido y/o para reducir la inmunogenicidad potencial del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol, "PEG"). Puede utilizarse PEG para impartir solubilidad en agua, tamaño, índice lento de depuración renal e inmunogenicidad reducida a la proteína de fusión. Véase, por ejemplo, la patente de US N° 6.214.966. En el caso de pegilados, la fusión del polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado a PEG puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede realizarse el pegilado introduciendo primero una mutación de cisteína en el polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado, tras derivatización específica en el área con PEG-maleimida. Se puede añadir el residuo de cisteína al C-terminal del polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado. Véase, por ejemplo Tsutsumi, Y. et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8548 - 8553.

Las variantes de los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado original o combinaciones de los mismos.

Las variantes incluyen polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis. Pueden identificarse mediante el cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes las variantes con actividad mejorada. Por ejemplo truncamiento o mutaciones de punto de los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado de esta invención.

En una forma de realización, una biblioteca diversificada de variantes se genera por mutagénesis combinatoria a nivel del ácido nucleico y se codifica por una biblioteca de genes diversificada. Puede producirse una biblioteca diversificada de variantes por ejemplo, enzimáticamente ligando una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas, de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias de aminoácidos variantes potenciales expresables como polipéptidos individuales, o, alternativamente como un conjunto de polipéptidos más grandes de IFN - $\alpha 2$ mejorado (por ejemplo expresión en fago) que contiene el conjunto de las secuencias. Hay una variedad de métodos que pueden utilizarse para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede realizarse en un sintetizador automático de ADN, luego el gen sintético se liga a un vector de expresión adecuado. 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. Son conocidos en la materia métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (véase, por ejemplo, Itakura. Et al. 1984, Annu. Rev. Biochem. 53: 323 - 356).

Se conocen en la disciplina varias técnicas para los productos de cribado génicos de bibliotecas combinatorias producidas por mutaciones de punto o truncación, y para el cribado de bibliotecas de ADNc para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Esta técnicas son adaptables para el rápido cribado de las bibliotecas génicas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado para una actividad específica. Las técnicas más utilizadas susceptibles de análisis de alto rendimiento para el cribado de grandes bibliotecas génicas incluyen clonación de la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformando las células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores y expresando los genes combinatorios

en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. La mutagénesis de conjunto recursiva (MRC) es una técnica que mejora la frecuencia

5 de los mutantes funcionales en la bibliotecas y puede utilizarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar las variantes deseadas.

Composiciones Farmacéuticas de la Invención

10 La invención presenta también composiciones farmacéuticas que pueden administrarse a un paciente para conseguir un efecto terapéutico. Pueden prepararse composiciones farmacéuticas de esta invención para la administración mediante la combinación de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado con el grado de pureza deseado en una cantidad efectiva farmacéuticamente con vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 Se pueden utilizar los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado y las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular y subcutánea), por vía tópica, oral, inhalatoria o local.

20 Pueden utilizarse los polipéptidos mejorados de la invención en composiciones farmacéuticas por cualquier método adecuado de administración, incluyendo de manera no limitante las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular o intratecal. De este modo, los polipéptidos descritos anteriormente en su forma preferente se combinarán con un vehículo farmacéutico estéril aceptable, como el cinco por ciento de dextrosa, solución de lactato de Ringer, solución salina normal, agua estéril o cualquier otra solución tampón fisiológica preparada comercialmente diseñada para infusión intravenosa. Se entenderá que variarán la selección de la solución del vehículo, la dosis y la administración de la composición con el sujeto y el entorno clínico en particular, y se regirá por los procedimientos médicos estándar.

25 Según los procedimientos de la presente invención, pueden administrarse estas composiciones farmacéuticas en cantidades eficaces para inhibir o mejorar las consecuencias patológicas o los síntomas asociados con la EM o el cáncer.

30 Puede producirse la administración de los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la presente invención por inyección intravenosa en bolo, por infusión intravenosa continua o por una combinación de ambas vías. Alternativamente o además, pueden tomarse los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado mezclados con excipientes apropiados para la circulación por la zona intramuscular.

35 Evidentemente, es menos adecuada la administración de los polipéptidos por vía oral debido a la susceptibilidad a la digestión por ácidos gástricos o enzimas intestinales, sin embargo pueden utilizarse para la administración oral en varias formulaciones específicas de realizaciones.

40 Pueden emplearse en la preparación de las composiciones en formas de dosificación líquida por vía oral (por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones), medios farmacéuticos típicos como el agua, glicoles, aceites, alcoholes, aromatizantes, conservantes, colorantes y similares.

45 Del mismo modo, se empleará en preparaciones de las formas de dosificación sólidas por vía oral (por ejemplo, polvos, comprimidos y cápsulas), vehículos como almidones, azúcares, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan una forma de dosificación oral adecuada para las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

50 Es menos adecuada la administración de polipéptidos por vía tópica, sin embargo pueden utilizarse para formulaciones específicas de tratamiento local.

55 Pueden formularse para la administración tópica, polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la presente invención, la utilización de bases hidratantes blandas como las pomadas o las cremas. Son ejemplos de pomadas adecuadas, las vaselinas, las siliconas volátiles, lanolina y emulsiones de agua en aceite.

60 Para la administración por inhalación, los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado para la utilización según la presente invención se presenta convenientemente en forma de aerosol en un envase presurizado o en un nebulizador con la utilización de un propulsor adecuado, por ejemplo, didorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada como la lactosa o el almidón.

65 Son particularmente útiles los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado y las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración por vía intravenosa. Las composiciones para la administración

comprenderán una solución de polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una forma preferente de vehículo acuoso. Puede utilizarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materias indeseables. Pueden esterilizarse las composiciones mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas.

Puede determinarse fácilmente por un experto en la materia una composición farmacéutica típica para la administración por vía intravenosa. Las cantidades administradas son claramente proteínas específicas y dependen de su potencia y perfil farmacocinético. Serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia los procedimientos actuales para la preparación de composiciones administrables por vía parenteral, descritos con más detalle en publicaciones como Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990.

Pueden administrarse en tratamientos terapéuticos las composiciones que contienen polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado o un cóctel de los mismos (es decir; con otras proteínas). En aplicaciones terapéuticas, se administran las composiciones a pacientes con EM, cáncer y trastornos asociados con la expresión del IFN - $\alpha 2$ incrementado del IFN - $\alpha 2$ en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para tal utilización dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente.

Pueden aplicarse administraciones únicas o múltiples de composiciones dependiendo de la dosificación y la frecuencia según sea necesario y tolerado por el paciente. En cualquier caso, la composición debería presentar una cantidad suficiente de polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado de esta invención para tratar de manera efectiva al paciente. Generalmente, dependiendo del modo deseado de administración, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán aproximadamente de un 1% a un 99 % en peso de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la invención y de un 99 % a un 1 % en peso de un excipiente o vehículo farmacéutico adecuado. En su forma preferente, la composición será aproximadamente del 5 % al 75 % en peso de un/los polipéptido(s) de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la invención, siendo el resto de excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados.

Los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la presente invención o sus composiciones farmacéuticamente aceptables, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz que variará dependiendo de una variedad de factores que incluyen actividad específica de un polipéptido particular de IFN - $\alpha 2$ mejorado empleado, la estabilidad metabólica y la longitud de acción del polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado, la edad, el peso corporal, el estado de salud, el sexo, la dieta del paciente, el modo y tiempo de administración, la proporción de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de los estados de enfermedades particulares y el portador sometido a terapia. Generalmente, una dosis diaria terapéuticamente efectiva es de aproximadamente de unos 0,1 μg a 1000 μg / kg de peso corporal por administración de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la invención, preferiblemente, del 0,5 μg a 100 μg / kg del peso corporal por administración. Por ejemplo, para una administración de una persona de 70 kg, el intervalo de dosificación sería de unos 10 μg a 100 μg por administración de un polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la invención en función del régimen de tratamiento. Por ejemplo, si el polipéptido de IFN - $\alpha 2$ mejorado de la invención o la formulación que contiene el polipéptido se administra de una a varias veces al día, sería necesaria luego una dosis más baja que si se administra una formulación semanal, mensual o con menor frecuencia.

Se prevé que se administren en dosis adecuadas los polipéptidos de IFN - $\alpha 2$ de la presente invención. Las dosis generalmente se ajustan por encima o por debajo de la dosis máxima tolerada (DMT). Se observaron los signos indicativos de toxicidad como la toxicidad hematológica, la anemia, trombocitopenia, leucopenia: como la toxicidad gastrointestinal, diarrea, dispepsia, disfagia, N/V, dolor abdominal, como los aumentos de toxicidad hepática en la bilirrubina, alcalinofosfatasa y LFTs, como el riñón y la vejiga, hematuria microscópica, piuria, azotemia, proteinuria, insuficiencia renal aguda, síndrome nefrótico, glucosuria, albuminuria, como pulmonar, ortopnea, disnea, broncoespasmo, tos, edema pulmonar, ARDS, como síncope por toxicidad cardíaca, MI, SVT, bradicardia, taquicardia, mareos, hipotensión e hipertensión. La toxicidad neurológica provoca confusión, temblores, entumecimiento, parestesias, incapacidad para concentrarse, somnolencia, alucinaciones, encefalopatía, convulsiones, coma, retraso psicomotor, trastornos de la memoria, sequedad de boca, sudoración, trastornos de personalidad, agitación, neuropatía, depresión, ansiedad, afasia, desprendimiento de retina con pérdida de visión, dolor de ojos, hemianopsia, cambio gustativo, dolor de cabeza, síncope e insomnio. Se observó en la toxicidad dérmica erupción cutánea, urticaria, necrosis epidérmica y erupción maculopapular.

La toxicidad metabólica se manifiesta como hiperglucemia. Además se controla la coagulación para el incremento en PT / PTT. También son respuestas tóxicas potenciales al interferón, la presencia de faringitis, alopecia, fatiga, malestar general, anorexia, pérdida de peso, fiebre, escalofríos, mialgia, artralgia y cianosis.

Indicaciones TerapéuticasEsclerosis múltiple (EM)

- 5 Son aprobadas para el tratamiento de la EM remitente-recidivante las dos formas del IFN, IFN - β 1a e IFN - β 1b. Para tratar las verrugas genitales se utiliza también el IFN - β . Son útiles los polipéptidos de IFN - α 2 mejorado de esta invención en las anteriores enfermedades o trastornos y útiles también para el tratamiento de otras formas de EM como la EM secundaria progresiva, la EM primaria progresiva y la EM progresiva recidivante. Por útil, se entiende que los polipéptidos de IFN - α 2 mejorado son útiles para el tratamiento de la enfermedad, por ejemplo, ya sea para prevenir la enfermedad o para prevenir la progresión de la enfermedad a un estado más grave o para mejorar o reducir los síntomas de la enfermedad como la EM.

Cáncer

- 15 A pesar de los numerosos avances en el tratamiento contra el cáncer, los conocidos cambios de estilo de vida pueden reducir considerablemente el riesgo de cáncer y los signos de alerta temprana que algunos tipos de cáncer desarrollan, muchos pacientes aún desarrollan tipos de cáncer para los que no existen terapias convencionales disponibles que puedan ofrecer esperanzas de cura o paliación significativa. Es conocido que el IFN - α 2 tiene efectos anticáncer.

- 20 Una persona con cáncer avanzado puede presentar uno o más de los siguientes signos o síntomas: presencia de tumor canceroso, fatiga, dolor, estado de rendimiento disminuido de la carga tumoral y los conocidos síntomas asociados a cada cáncer específico.

- 25 Para practicar la invención, se administran al paciente mutantes de IFN - α 2 para mostrar uno o más de los signos o síntomas anteriores en cantidades suficientes para eliminar o al menos aliviar uno o más de los signos o síntomas.

Infección por virus de la hepatitis C (VHC)

- 30 Las terapias actuales para el tratamiento de la infección por VHC sufren de ciertos inconvenientes. Los regímenes de dosificación única diaria (QD), cada tres días (QOD) o tres veces por semana (TIW), inyecciones de IFN - α en periodos de tratamiento prolongado provocan uno o más de los siguientes inconvenientes: (1) Los regímenes de dosificación son incómodos para los pacientes y en algunos casos, es resultado de la conformidad reducida del paciente; (2) los regímenes de dosificación están a menudo asociados a efectos adversos causando malestar adicional al paciente, y en algunos casos es resultado de la conformidad reducida del paciente; (3) los regímenes de dosificación dan como resultados "picos" (Cmax) y "depresiones" (Cmin) en una concentración de suero de IFN - α , y durante los periodos de "depresión" el virus puede reproducirse y/o infectar las células adicionales y/o mutar; (4) en algunos casos, la reducción de log en el título viral durante la temprana respuesta viral es insuficiente para llevar a cabo una respuesta viral sostenida que resulta finalmente en la depuración del virus. La presente invención podría tener un impacto significativo en la mejora del potencial terapéutico del tratamiento de una infección por el virus de la hepatitis.

Diabetes mellitas insulinodependiente (DMID)

- 45 Es tema de debate la etiología de la DMID. Parece ser multifactorial, incluyendo la predisposición genética y las influencias del entorno. Se han identificado fuertes asociaciones entre la DMID y los HLA's específicos codificados por la región del complejo de histocompatibilidad mayor situado en el brazo corto del cromosoma 6. Los principales alelos de alto riesgo son el DR3 y el DR4. Se cree que son importantes las influencias ambientales que incluyen los virus y varias líneas de pruebas así lo indican. Algunos virus diabetógenos o asociados (paperas, sarampión, rubéola, encefalomiocarditis M, coxsakievirus B y reovirus) se han asociado de manera epidemiológica con el desarrollo de DMID o puede provocar diabetes cuando se inocular en los roedores.

- 50 Los virus diabetógenos pueden infectar directamente las células B en el cultivo. Además se ha aislado el coxsakievirus B4 del páncreas de un niño con DMID de nueva aparición que falleció por cetoacidosis severa, y este virus provoca la diabetes en animales de experimentación junto a antígenos virales en las células B de los animales infectados. Las células B de los pacientes con DMID secretaron interferón alfa, de este modo los polipéptidos de IFN - α 2 antagonista pueden provocar un impacto significativo en la mejora del potencial terapéutico de la DMID.

Lupus eritematoso (LE)

- 60 El LE es una enfermedad autoinmune que causa inflamación y daña varios tejidos y partes del cuerpo, incluyendo las articulaciones, los riñones, el corazón, los pulmones, el cerebro, los vasos sanguíneos y la piel. Los síntomas más comunes del LE incluyen articulaciones doloridas o hinchadas (artritis), fiebre, fatiga prolongada o extrema, erupciones en la piel y problemas renales. Aunque aún se desconoce la causa del LE, se cree que es causado por una combinación de factores genéticos, ambientales y posiblemente hormonales. El LE puede caracterizarse por periodos de enfermedad o de recrudescimiento y periodos de bienestar o de remisión. En consecuencia, los objetivos de un tratamiento eficaz del LE es la prevención de los periodos de recrudescimiento, la

minimización del daño de los órganos y las complicaciones así como mantener las funciones corporales normales. Los medicamentos prescritos comúnmente para el LE incluyen fármacos antiinflamatorios sin esteroides (AINE), acetaminofeno, corticoides, antipalúdicos y fármacos inmunomoduladores. Debido al limitado éxito de los fármacos

5 disponibles en la actualidad y sus efectos secundarios potencialmente graves, es importante proporcionar un tratamiento eficaz alternativo para el LE.

10 La composición descrita en la presente puede ser eficaz en la reducción y/o eliminación de varios síntomas en pacientes con LE.

Habiendo ahora descrito en general la invención, la misma se entenderá más fácilmente gracias a los ejemplos que se describen a continuación de manera no limitante y a las ilustraciones que los acompañan.

15 EJEMPLOS

Métodos:

20 **(i) Mutagénesis dirigida.** Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida mediante amplificación por PCR del plásmido de la expresión pT72Ca2 con 18 - 21 cebadores nucleótidos que contienen el codón mutado utilizando polimerasas de alta fidelidad *pwo* (Boehringer Mannheim) y *pfu* (Stratagene) como se ha descrito previamente (Piehler, J. & Schreiber, G. 1999, *J. Mol. Biol.* 294, 223 - 237). Tras la fosforilación y la ligadura, los plásmidos mutados se transformaron en células de *E. coli* TG1. La secuencia del total expresó un gen que contiene la mutación que fue verificada por secuenciación de ADN.

25 **(ii) Expresión de la proteína y purificación.** Como se ha descrito previamente en (Piehler, J. & Schreiber, G. 1999, *J. Mol. Biol.* 294, 223 - 237), se expresaron en *E. coli* y se purificaron por intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño el IFN - $\alpha 2$ y el IFNAR2 - EC.

Se determinaron las concentraciones de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm con $\epsilon_{280} = 18070 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para el IFN - $\alpha 2$ y $\epsilon_{280} = 26500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para IFNAR2 - EC. Se expresó IFNAR1 - EC en Sf9 en células de insecto y se purificó tal y como se describe en (Arduini, R. M. et al., 1999, *Protein Science* 8, 1867-1877).

30 Se analizó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras la pureza de la proteína. Como se ha descrito previamente en (Piehler, J. & Schreiber, G. 1999, *J. Mol. Biol.* 289, 57 - 67) se determinó la concentración de la proteína IFN - $\alpha 2$ activa para todos los mutantes por filtración en gel analítico con IFNAR2 - EC. Para los estudios de unión de ligando se etiquetaron específicamente IFN - $\alpha 2$ e IFN - β usando la química de maleimida. El IFN - β se marcó directamente en su residuo de cisteína libre C17 por incubación de un exceso molar de 2 veces de maleimida (Sondas moleculares) Oregon Green 488 (OG488) durante 2 h en HBS. El IFN - $\alpha 2$ se marcó con OG488 tras la incorporación de un residuo de cisteína adicional (mutación S136C), que ha demostrado que no afecta a la interacción con IFNAR1 - EC o IFNAR2 - EC (Gavutis et al., 2005, *Biophysical Journal* 88(6): 4289 - 4302).

35 **(iii) Crecimiento y plegado del mutante IFN - $\alpha 2$ -YNS.** Se cultivó *E. coli* en un matraz de 750 ml. Se centrifugó la bacteria, se resuspendió en un tampón de lisis 30 ml y se sonicó en bacteriología durante 30' cinco veces. Tras la centrifugación a 16.000 rpm durante 30', se resuspendió el pellet (cuerpos de inclusión) en una solución de lavado tritón en ~ 30 ml (tritón al 0,5 %, 50 mM Tris8 y 100 mM NaCl). Se centrifugaron los cuerpos de inclusión a 25.000 g (14.500 rpm en ss34 sorval) y se lavaron 4-5 veces. Se realizó un lavado final para eliminar el tritón utilizando 50 mM Tris (8,4) con 100 mM NaCl. Se disolvieron los cuerpos de inclusión purificados en 5 ml de Guanidina 6 M durante 12 h a 4^o C con una agitación suave. Tras la centrifugación a 25.000 g durante 25', se conservó el sobrenadante y se desechó el pellet.

40 Para el plegado, se diluyó el sobrenadante 1:20 en Arginina 0,8 M pH 9,3, se agitó lenta y suavemente en un vórtice y se sacudió a 20^o C durante 2 h. Tras la centrifugación a 16.000 rpm durante 20' y un diálisis contra Tris 7,4, se purificó la proteína por cromatografía de intercambio iónico para producir ~ 5 mg / L de proteína pura.

45 **(iv) Medidas de afinidad de unión.** Se controló la interacción entre el recombinante de IFNAR1 - EC y el IFN - $\alpha 2$ por Espectroscopia de Interferencia Reflectométrica (RIF) en condiciones de incremento proporcional (Schmitt, H. M., et al., 1997, *Biosens. & Bioelectron.* 12, 809 - 816). Este procedimiento detecta la interacción biomolecular en interfaces como un cambio en el espesor óptico aparente de una fina capa de sílice. Se controla la unión a la superficie como un cambio en el espectro de interferencia. Un cambio de 1 pm equivale a aproximadamente 1 pg / mm² de proteína en la superficie. Se aplicó un segundo procedimiento en condiciones de unión en tiempo real por RPS (resonancia de plasmón superficial) utilizando el ProteON (Biorad). Todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando HBS (20 nM HEPES pH 7,5, 150 nM NaCl y 0,01% de Tritón X100) como tampón de migración. Se realizó por dos métodos la unión de la subunidad del receptor IFNAR1 a la superficie del chip. En uno, la no neutralización de mAb DB2 anti-IFNAR1 - EC se acopló a la superficie (dextrano amino funcionalizado AMD 500) a través de sus grupos amino expuestos por la química de acoplamiento amino.

50 El IFNAR1 - EC fue capturado por afinidad a la superficie seguida por reticulación con un segundo mAb AA3. En un segundo procedimiento, la cola marcada con His estaba directamente relacionada con la superficie NTA del chip. Se da en (Piehler, J. and Schreiber, G. 2001, *Anal Biochem.* 289, 173 - 186) una descripción detallada del procedimiento utilizado para medir la interacción del interferón de IFNAR2 - EC. Para la unión débil, se obtuvo la determinación de la constante de disociación K_D de la respuesta del equilibrio marcado contra la concentración de proteína y se equipó según la ley de acción de masas. Para interacciones de unión más duras, se determinaron las

constantes cinéticas y se calculó la afinidad a partir de la proporción $K_{off}/k_{on} = K_D$ directamente a partir de la respuesta de equilibrio.

(v) Ensayo de actividad de protección antiviral. Se analizó la actividad antiviral del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje y de tipo mutante como la inhibición del efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular (VEV) en células WISH humanas (Evinger, M. et al., 1981, *Arc. Biochem. Biophys.* 210, 319 - 329). Se determinó la actividad relativa de los mutantes de IFN - $\alpha 2$ como la concentración necesaria para una protección del 50 % de las células en relación a la concentración del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje necesaria para la protección del 50 %.

(vi) Ensayo antiproliferativo. Se analizó tal y como se describe en (Piehler, J. et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275, 40425 - 40433) la actividad antiproliferativa del IFN - $\alpha 2$ en células del linfoma de Daudi Burkitt. Se trataron con IFN las células durante 60 h. Se determinó el número de células vivas utilizando un Kit de tinción de células (Biological Industries Co, Israel) en base a la detección colorimétrica de la segmentación de la sal de tetrazolio XTT a formazan. Se llevó a cabo el ensayo antiproliferativo en las células WISH por la adición de interferón a diferentes diluciones en los medios de crecimiento y se controló la densidad celular tras 72 h mediante la tinción con cristal violeta.

(vii) Errores. El error (σ) en K_D para la unión del IFN - $\alpha 2$ - IFNAR2 como medida en RfS es del 20 % y para la afinidad relativa (tipo salvaje/mutante) es del 30 %. Para IFN - $\alpha 2$ -IFNAR1, el error (σ) en K_D es del 35 % y para la afinidad relativa (tipo salvaje/mutante) es del 50 %. Utilizando 2σ (95 % de confianza) como nivel de confianza básico, sugeriría que un mínimo de dos cambios puede ser significativo. La magnitud del error (σ) para las mediciones de la actividad biológica individual (antiviral o antiproliferativa) es del 35 %. Por lo tanto, un nivel de confianza de 2σ entre dos medidas sugeriría que las diferencias menores de 2 están dentro del error experimental.

(viii) Experimentos de microarrays de oligonucleótidos manchados. Los microarrays de vidrio recubierto de poli (L) lisina contienen casi 19.000 sondas diferentes (conjunto de oligonucleótidos humanos de Compugen) fueron adquiridos de CAG (Center for Applied Genomics, Nueva Jersey). Se probaron los microarrays con una mezcla consistente en cianina (Cy) 3 o ADNc marcado con Cy5 que representa el tratamiento del IFN contra el sin tratamiento (control). Durante 16 horas, se trataron las células WISH con diferentes IFNs y se extrajeron sus ARN (RNeasy Midi Kit, Qiagen), de los que 100 μ g se sometieron a una transcripción inversa (M-MLV H point mutant RT enzyme, Promega) con nucleótido dUTP modificado con un grupo aminoalilo (Ambion) mezclado en la mezcla de nucleótidos a una proporción 4 : 1 aa-dUTP de dTTP. El ADNc producido se marcó con el activado de Cy3 de NHS la sonda fluorescente de Cy5 (Amersham), que se une a la aa-dUTP. Se evaluó la incorporación (espectrofotómetro NanoDrop) y los ADNc marcados se mezclaron (tratamiento con un color y control con el otro) en cantidades equivalentes de tinción fluorescente (100 pmoles de cada uno), en definitiva 2X SSC, 0,08 % SDS y 6 μ l de solución de bloqueo (Amersham), en 100 μ l volumen de diana, desnaturalizado a 95° C durante 3 minutos, enfriado y aplicado entre un cubreobjetos (LifterSlip, Erie Scientific Company) y la matriz. La hibridación se produjo a 55° C durante 12 h en la oscuridad. Posteriormente, el portaobjetos se lavó durante 5 minutos en 2X SSC, 0,5 % SDS a 55° C, cinco minutos en 0,5X SSC a temperatura ambiente y por último, cinco minutos en 0,05X SSC a temperatura ambiente. A continuación se secó por centrifugado durante 3 minutos a 1.000 rpm y se almacenó en la oscuridad hasta su escaneado.

(ix) Imagen de microarray y análisis de datos. El escaneo de los microarrays hibridados se realizó con el escáner de microarray de ADN (Agilent). La detección de marcas automáticas, la sustracción de fondo y la cuantificación de la intensidad se realizó con el software SpotReader (Niles scientific). La normalización de datos, el filtrado y el análisis de conglomerados se realizó con el software GeneSpring (SiliconGenetics). El análisis se basa en el tratamiento para controlar la proporción de cada mancha e incluye manipulaciones como la filtración de datos de los indicadores de salida de SpotReader, una indicación de la calidad de la señal, relativamente al fondo (ruido). Cada tratamiento (enfermedad) se representa por dos réplicas de microarrays dye - swap. Se integró una lista inicial de genes de interferón modulado por los genes más allá del umbral de 1,7 en al menos dos condiciones, tolerando sólo un indicador "ausente" ("A"), indicativo de un punto "ruidoso" en todas las condiciones por gen. Se eligió este criterio tras haberse dado cuenta que la regulación por incremento o descenso se observa en más de un tratamiento con IFN, por lo que es necesario la elección de dos condiciones como mínimo y un bajo umbral de rigor para incluir ISGs modificado en niveles relativamente bajos.

Se exportó la lista de genes a una hoja de cálculo de Excel, y contenía el tratamiento medio para el control del valor de la proporción, los valores reproducidos, test - t valores p para test t, que es una estimación del error técnico del microarray basado en la distancia entre las réplicas y los códigos indicadores. Los genes fueron entonces cribados para la significación, mediante la comparación de la distancia entre cada par de réplicas y entre las condiciones, mirando también los valores p y la aparición del indicador "A". Era necesario este tedioso análisis ya que la selección estadística omitió claramente la regulación por incremento o disminución, debido al ruido relativamente grande causado por un bajo número de réplicas por condición. Un valor medio más allá del umbral de 1,7 que tiene una de sus réplicas por debajo de este umbral o con una gran distancia entre réplicas respecto a la media y sin otras condiciones con niveles similares y significativos, no se consideró una modulación *bona - fide*, sino ruido técnico, y por consiguiente el gen de la lista se excluyó. La lista final consistió en 395 genes, regulados por incremento o disminución por interferones a las 16 horas del tratamiento. Se realizó el análisis de conglomerados en esta lista tras importarlo de nuevo a GeneSpring.

EJEMPLO 1. Caracterización de la interacción del IFN - $\alpha 2$ - IFNAR1 - EC utilizando un sistema biosensor óptico

Se investigó la interacción de IFNAR1 - EC al IFN - $\alpha 2$ por la detección en fase sólida de marcador libre utilizando RfS. Esta tecnología requiere la inmovilización en la superficie del chip de uno de los compuestos que

interactúan. Se utilizó el procedimiento empleado con éxito anteriormente para IFNAR2 - EC en el que se inmovilizó el receptor utilizando mAbs que se inmovilizan a la superficie a través de amino - acoplamiento (Piehler, J. and Schreiber, G. 2001, *Anal. Biochem.* 289, 173 - 186). Se acopló el anti IFNAR1 - EC sin neutralizar al mAb DB2 a la superficie del dextrano amino funcionalizado AMD 500 a través de sus grupos amino expuestos. Se capturó por afinidad al IFNAR1 - EC para la superficie de mAb seguido por reticulación con un segundo mAb AA3. El seguimiento del proceso de RfS en tiempo real se muestra en la Figura 1A. Se determinó la actividad de unión de IFNAR1 - EC unido a la superficie de RfS por una inyección de proteína de IFN - α 2 en concentraciones que van desde 0,12 hasta 4 μ M. Debido a la baja afinidad de unión del IFN - α 2 al IFNAR1 - EC los datos cinéticos de la asociación y disociación no se pudieron determinar. Por lo tanto, se determinó la afinidad de unión a partir de un punteo la respuesta del estado estacionario contra la concentración de proteína según la ley de acción de masas. Esto da como resultado una constante de afinidad de 1,5 μ M para el IFN - α 2 de tipo salvaje (Lamken, P. et al., 2004, *J Mol Biol* 341, 303-318).

15 EJEMPLO 2. MAPEO DE LA ZONA DE UNIÓN DEL IFN - α 2 PARA IFNAR1

Para localizar la zona de unión del IFNAR1 en el IFN - α 2, se realizó un escáner de Ala en la mayoría de los residuos localizados en las hélices B y C (Figura 2 y 3). En total, se produjeron 21 mutaciones puntadas y se midió su afinidad de unión hacia IFNAR2 e IFNAR1 por RfS o ProteON. Como las mutaciones se encuentran en la superficie opuesta a la zona de unión de IFNAR2 en el IFN - α 2, las afinidades de unión de las diferentes proteínas mutantes de IFNAR2 a las del IFN - α 2 de tipo salvaje son similares (Tabla 1). Esto supone un garantía, como así lo corrobora el pliegue apropiado de todas las proteínas mutantes y sus concentraciones activas. Mientras que la unión del IFN - α 2 con el IFNAR2 - EC presenta una clara señal cinética, la unión hacia el IFNAR1 - EC es mucho más débil y tiene que ser analizada según señal de la unidad de refracción (UR) de la afinidad del estado estacionario mediante la variación de la concentración del ligando. En este caso, es esencial el conocimiento de las concentraciones correctas y precisas de todas las proteínas del IFN - α 2. Por lo tanto, se validaron todas las concentraciones de proteína mutante en una columna analítica de filtración en gel por su capacidad para unirse al IFNAR2 - EC. Se resumen en las Tablas 1 y 3 y en la Figura 3A los resultados de todas las mediciones de unión. Tres mutaciones individuales causan un incremento en la unión (H57A, E58A, Q61A) mientras que 6 mutaciones provocan una disminución en la unión (F64A, N65A, T69A, L80A, Y85A, Y89A). Sin embargo, no se identificaron puntos de acceso para la unión, por lo tanto, ninguna de las mutaciones llevan a un cambio de más de 5 veces en cuanto a la afinidad. Para corroborar los efectos de una mutación individual, se preparó un mutante triple que contiene mutaciones individuales L80A, Y85A, Y89A (designado en adelante como LYY) y un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6) (designado en adelante como NLYY). La unión de estas dos proteínas mutantes se encontraba por debajo del umbral de la medición.

TABLA 1: Constantes termodinámicas y cinéticas para las interacciones del IFN - $\alpha 2$ mutante (hélices B y C y lazo C - D) con IFNAR2 - EC e IFNAR1 - EC

Mutante de IFN	IFNAR2 - EC					IFNAR1 - EC			
	K_d [s ⁻¹]	K_D [nM]	K_D Ts /mut	^a ΔG^0 Kcal / mol	^b ΔG^0 Kcal / mol	^c K_D [μ M]	K_D Ts /mut	^b ΔG^0 Kcal / mol	^c $\Delta \Delta G^0$ Kcal / mol
Ts	0,011	3		-11,6	0,0	1,6		-7,9	
H57A	0,015	4	1,0	-11,4	-0,2	0,69	2,1	-8,4	0,5
E58A	0,011	3	1,3	-11,6	0,0	0,31	4,7	-8,8	0,9
Q61A	0,012	3	1,3	-11,6	0,0	0,59	2,5	-8,5	0,6
Q62A	0,009	3	1,3	-11,6	0,0	1,82	0,8	-7,8	-0,1
F64A	0,013	4	1,0	-11,4	-0,2	3,33	0,4	-7,4	-0,5
N65A	0,012	3	1,3	-11,6	0,0	5,00	0,3	-7,2	-0,7
S68A	0,010	3	1,3	-11,6	0,0	2,00	0,7	-7,8	-0,2
T69A	0,012	3	1,3	-11,6	0,0	3,70	0,4	-7,4	-0,6
K70A	0,010	3	1,3	-11,6	0,0	2,56	0,6	-7,6	-0,3
D71A						1,67	0,9	-7,8	-0,1
S73A	0,014	4	1,0	-11,4	-0,2	2,94	0,5	-7,5	-0,4
T79A	0,013	4	1,0	-11,4	-0,2	1,45	1,0	-7,9	0,0
L80A	0,019	5	0,8	-11,3	-0,3	8,70	0,2	-6,9	-1,1
K83A	0,011	3	1,3	-11,6	0,0	1,47	1,0	-7,9	0,0
Y85A	0,019	5	0,8	-11,3	-0,3	4,17	0,4	-7,3	-0,6
T86A	0,016	4	1,0	-11,4	-0,2	2,78	0,5	-7,6	-0,4
Y89A	0,017	5	0,8	-11,3	-0,3	5,88	0,3	-7,1	-0,8
Q90A	0,013	4	1,0	-11,4	-0,2	1,43	1,0	-7,9	0,0
N93A	0,016	4	1,0	-11,4	-0,2	3,23	0,5	-7,5	-0,5
E96A	0,013	4	1,0	-11,4	-0,2	2,86	0,5	-7,5	-0,4
V99A	0,010	3	1,3	-11,6	0,0	2,00	0,7	-7,8	-0,2
HEQ	0,01	3	1,0	-11,6	0,0	0,083	20	-9,6	1,7
NLYY Extremo de $\alpha 8$	0,002	0,15	18	-13,3	1,8				
α IFN - β	0,0012	0,1		-13,6		0,066		-9,75	1,85

^a ΔG^0 calculado a partir de $\Delta G^0 = R7 \ln K_D$; ^b $\Delta \Delta G^0 = \Delta G^0_{mut} - \Delta G^0_{ps}$; ^c K_D se determina K_D a partir de la unión de equilibrio en la superficie. Datos obtenidos de Lamken et al., 2004, J. Mol. Biol. 341, 303 - 318.

EJEMPLO 3. Actividad antiproliferativa y antiviral de los mutantes de IFN - $\alpha 2$

Se comprobó la actividad antiviral como la inhibición del efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular (VEV) en células WISH (línea celular epitelial humana de origen amniótico). Se determinó la actividad antiproliferativa tanto en las células WISH como en las células Daudi, así como el 50 % de inhibición del crecimiento celular (como se describe en los Procedimientos). La Figura 4A muestra el resultado de la aplicación de una dilución en serie de concentraciones de IFN - $\alpha 2$ e IFN - β durante 72 h en la intensidad exhibida por las células WISH tras la tinción, a partir del cual se puede deducir la concentración del interferón promoviendo un efecto antiproliferativo. Se escanearon los pocillos por análisis de densimetría y se muestran los resultados contra la concentración de

proteína aplicada (Figura 4B). Se hizo lo mismo para determinar la potencia antiviral de los interferones en las células WISH (Figura 4C). El 50 % del punto de actividad, así como el índice de cambio en la actividad (pendiente) se deduce a partir de una curva de respuesta de la dosis de un IFN, Eq.1.

$$y = A_0 + A / (1 + (c/c_{50})^s) \quad [\text{Eq. 1}]$$

5 en la que y es la transmitancia que se relaciona con el número de células, A_0 es el *offset*, A es la amplitud, c es la concentración, c_{50} es la concentración que da el 50 % de actividad y s es la pendiente. El promedio de las concentraciones de IFN - $\alpha 2$ e IFN - β promueven el 50 % de protección antiviral, que son del 0,85 y 0,43 pM respectivamente (promedio de más de 6 experimentos). El promedio de las concentraciones del IFN - $\alpha 2$ y el IFN - β promueven el 50 % de la actividad antiproliferativa, que son de 1.360 y 29 pM (promedio de más de 17 y 7 experimentos respectivamente). Curiosamente, la concentración de IFN - $\alpha 2$ promueve el 50 % de la actividad antiproliferativa en las células Daudi que es sólo del 0,5 pM (Tabla 2), que es más de 1.000 veces menor que la medida para las células WISH, destacando la importancia de la utilización de la misma línea celular para todos los experimentos.

La actividad antiviral y antiproliferativa de todas las proteínas mutantes del interferón se determinó en relación al IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (ts/mut) con los resultados que se resumen en las Tablas 2 y 4. Como se encontró por la afinidad de unión para IFNAR1 - EC, las actividades antiproliferativas y antivirales no mutaron radicalmente. El único mutante que provoca un incremento significativo en la actividad antiviral es el E58A (> 2 veces). L80A, Y85A e Y89A provocan una disminución significativa en la actividad antiviral (pero no más de 6 veces). Sin embargo, el combinado de mutantes LYY y NLYY redujo la potencia antiviral en 30 y 100 veces respectivamente. Esta reducción se ajusta más o menos a los efectos aditivos de las mutaciones individuales (para LYY, $0,5 \times 0,26 \times 0,20 = 0,029$, similar al resultado obtenido para el mutante triple). El efecto en la actividad antiproliferativa de la misma serie de mutantes es más significativa, tanto con E58A como con Q61A, que causan un incremento significativo en la actividad, mientras que N65A, T69A, L80A, Y85A e Y89A provocan una disminución significativa en la actividad. Por otra parte, la magnitud de la disminución en la actividad se mide en el ensayo utilizando células WISH que son significativamente mayores que las medidas para la protección antiviral. El LYY múltiple y los mutantes de NLYY reducen la actividad en 190 y 1.100 veces respectivamente. En este caso, las mutaciones individuales sobreestiman el efecto medido para los mutantes múltiples unas 30 veces (para LYY, $0,14 \times 0,035 \times 0,044 = 0,00022$ contra el valor medido experimentalmente de 0,0057 y para NLYY $0,16 \times 0,14 \times 0,035 \times 0,044 = 0,000035$ contra el valor medido experimentalmente de 0,00092). Se representan en la Figura 5A los resultados antiproliferativos y antivirales para todos los mutantes analizados. Para más interés, se ha añadido también el valor medido para el IFN - β . Al parecer, es en este gráfico en el que la respuesta antiproliferativa es mucho más sensible al mutante IFN - $\alpha 2$ específico si se compara con la respuesta antiviral. Por otra parte, esta tendencia se ajusta también a los datos para el IFN - β , para el que la actividad antiviral es 2 veces mayor a la del IFN - $\alpha 2$ (similar a la actividad antiviral del mutante E58A), mientras que su actividad antiproliferativa es 50 veces mayor. La comparación de la actividad biológica con la afinidad de unión medida para IFNAR1 muestra que ambas actividades generalmente suben con la afinidad de unión pero no en toda la escala (Figura 5B).

TABLA 2: Actividad biológica de mutantes de IFN - α 2

Mutante de IFN	Actividad antiviral (WISH)			Actividad antiproliferativa (WISH)			Antiproliferativa (DAUDI)	
	50% (pM)	Ts / mut	Pendiente ^a Ts / mut	50% (nM)	Ts / mut	Pendiente ^a Ts / mut	50% (pM)	Ts / mut
ts	0,85			1,36			0,5	
H57A	0,57	1,5	1,08	0,76	1,8	1,0	1,12	0,56
E58A	0,26	3,3	0,95	0,25	5,4	1,15	0,20	2,45
Q61A	0,45	1,9	1,04	0,49	2,8	1,65	0,54	0,92
Q62A	0,45	1,9		1,05	1,3		0,45	1,12
F64A	0,77	1,1		2,72	0,5		0,68	0,73
N65A	1,06	0,8	0,99	8,00	0,17	1,48	0,58	0,86
S68A	0,57	1,5		0,68	2,0		0,52	0,96
T69A	0,94	0,9		3,40	0,4		0,31	1,61
K70A	0,71	1,2		1,70	0,8		0,33	1,51
D71A	0,61	1,4		1,94	0,7		0,30	1,67
S73A	0,61	1,4		2,27	0,6		0,57	0,88
T79A	0,61	1,4		1,94	0,7		0,42	1,20
L80A	1,70	0,5		9,71	0,14		0,47	1,07
K83A	0,65	1,3		1,36	1,0		0,56	0,89
Y85A	3,27	0,26	1,0	39,0	0,035	1,84	1,52	0,33
T86A	0,77	1,1		1,36	1,0	2,2	0,35	1,41
Y89A	4,25	0,20	1,0	30,0	0,045		3,13	0,16
Q90A	0,71	1,2		0,72	1,9		0,45	1,11
N93A	0,85	1,0		1,94	0,7		0,60	0,84
E96A	1,06	0,8		3,40	0,4		1,25	0,4
V99A	1,13	0,75	1,32	1,84	0,74		0,51	0,98
LYY	24,29	0,035		238	0,0057	4,1		
NLYY	92,39	0,0092		1478	0,00092	3,2		
HEQ	0,41	2,07		0,05	24,18			
Col α 2	0,3	3		0,13	10			
IFN - β	0,43	2	0,72	0,03	42,86	0,63		

LYY es el mutante triple L80A, Y85A, Y89A. NLYY (SEC ID N° 6) es el mutante cuádruple que incluye LYY y N65A. Se obtiene el 50 % del punto de actividad por datos correctos de Eq. 1.

^a Pendiente es Eq. 1

EJEMPLO 4. La estabilidad del complejo ternario se ve reforzada por HEQ en comparación con el IFN - α 2

Dado que se encontraron tres mutaciones de Ala para aumentar la unión de 2 a 4 veces, estas tres mutaciones de IFN - α 2 (H57A, E58A, Q61A) se combinaron en una única proteína mutante del IFN - α 2, tal y como se describe en la presente, designado como HEQ (SEC ID N° 5).

La unión de los IFNs al dominio extracelular del receptor del interferón de Tipo I (IFNAR1 - EC) y el complejo ternario que incluye IFNAR1 - EC e IFNAR2 - EC se estudió mediante una espectroscopia de fluorescencia de reflexión interna (TIRFS). IFNAR2 - EC e IFNAR1 - EC estaban atados a través de sus etiquetas de histidina C-terminal en bicapas lipídicas de soporte sólido. Las cinéticas de disociación del IFN - α 2 de tipo salvaje, HEQ, y el IFN - β del IFNAR1 - EC como se controló por TIRFS se comparan en la Figura 1C. Se observó un incremento de 20 veces en la vida compleja para HEQ en comparación al IFN - α 2, y la cinética de disociación similar para el IFN - β (Tabla 3). En contraste, se obtuvieron constantes con velocidad de asociación similares para las tres especies. A partir de estos datos, se determinó una constante de disociación de equilibrio $K_D = 83$ nM para el complejo HEQ / IFNAR1 - EC, se determinó $K_D = 33$ nM para el complejo YNS / IFNAR1 - EC, $K_D = 1,6$ μ M para el complejo IFN - α 2 de tipo salvaje / IFNAR1 - EC y $K_D = 66$ nM para el complejo IFN - β / IFNAR1 - EC. La afinidad de unión de HEQ a IFNAR2 - EC es similar a la medida para el IFN - α 2 de tipo salvaje (5 nM), que es aproximadamente 10 veces más débil que la del IFN - β (Tabla 3). Por lo tanto, sólo la afinidad de HEQ hacia IFNAR1 es similar a la del IFN - β pero no hacia el IFNAR1.

El IFN induce la actividad biológica por la formación del ternario complejo (IFNAR1 - IFN - IFNAR2) en una estequiometría 1 : 1 : 1. Debido a la unión cooperativa de las dos subunidades de receptores unidos a la superficie, la afinidad de unión del ligando es mayor que la unión a IFNAR2 solo y depende de las concentraciones en la superficie del receptor relativo y absoluto (Lamken, P. et al., 2004, *J Mol Biol* 341, 303 - 318). Puede comprobarse el aumento de la estabilidad del complejo ternario por el aumento de la afinidad hacia IFNAR1 por las cinéticas de disociación del ligando. Por lo tanto, se compara la disociación de IFN - α 2 (SEC ID N° 2), HEQ (SEC ID N° 5), YNS (SEC ID N° 11) extremo de α 8 (SEC ID N° 7) e IFN - β en diferentes concentraciones de IFNAR1 - EC e IFNAR2 - EC en una relación estequiométrica. Para el IFN - β , se realizaron mediciones utilizando el mutante de I47A en

IFNAR2, que se une al IFN - β con una afinidad de 5 nM, similar a la del IFN - $\alpha 2$ hacia el IFNAR2 de tipo salvaje (Tabla 3). Esto viene a comparar únicamente el efecto de la concentración de la superficie de IFNAR1 en la disociación del ligando. Mientras que para el IFN - $\alpha 2$, la cinética de disociación depende en gran medida de la concentración de la superficie del receptor, se observó una superposición en la curva de disociación para IFN - β y HEQ. Esto demuestra claramente la mayor estabilidad del complejo ternario formado por el IFN - β y HEQ. Incluso en la concentración del receptor más alta (que se encuentra por encima de la concentración del receptor celular a 1.000 rpm por célula), se observó una disociación más rápida del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje que la del IFN - β y HEQ en las concentraciones del receptor más bajas. Sin embargo, si la concentración de la superficie del receptor se incrementa más allá, eventualmente se disocia el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje a tasas comparables con el IFN - β o HEQ. La estabilidad del complejo ternario es una función combinada de las concentraciones del receptor de superficie y de las afinidades de unión hacia los receptores individuales. Suponiendo que la estabilidad del complejo ternario está relacionada con la actividad biológica, no es sorprendente que la activación diferencial de la unión más estricta de los IFNs pueda ser capturada en las células con un alto número de receptores, ya sean naturales (como en las células Daudi) o debido a la transfección. Esto también pone de relieve el peligro de la transfección celular con los receptores de superficie celular en niveles no nativos, un tema generalmente ignorado.

Tabla 3: Constantes de velocidad y afinidades de la interacción del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje y mutantes de IFN - β y IFN - $\alpha 2$ con IFNAR1 - EC e IFNAR2 - EC

	IFNAR1 - EC			IFNAR2 - EC		
	K_a [$M^{-1}s^{-1}$] ^a	K_d [s^{-1}]	K_D [nM]	K_a [$m^{-1}s^{-1}$] ^a	K_d [s^{-1}]	K_D [nM] ^c
IFN - $\alpha 2$ ^a	$\sim 2,10^9$		1500	1.10^7	0,006	0,6
IFN - β ^b	$3,10^5$	0,020	66	1.10^7	0,0012	0,024
HEQ ^a	$3,10^5$	0,025	83	1.10^7	0,006	0,6
YNS	$3,10^5$			7.10^7	0,006	0,6
Extremo $\alpha 8$		0,01	33		0,002	0,024

^a Mutante de S136C marcado específicamente en la zona con maleimida Oregon Green 488

^b Marcado específicamente en la zona con maleimida Oregon Green 488 en el residuo libre C17

^c Interacción con IFNAR2 - EC I47A

EJEMPLO 5. Actividad antiviral y antiproliferativa en mutantes de IFN - $\alpha 2$: HEQ, MDL, extremo $\alpha 8$ e YNS.

Se ha observado que la potencia antiviral del IFN - β en las células WISH es sólo 2 veces mayor si se compara con el IFN - $\alpha 2$, mientras que su actividad antiproliferativa es aproximadamente 50 veces mayor. Las figuras 4B - 4C muestran las actividades antiproliferativas y antivirales del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje, HEQ (SEC ID N° 5) y el IFN - β , tal y como se mide en las células WISH. En estos ensayos el perfil de actividad de HEQ es comparable al del IFN - β . A pesar del gran aumento de la afinidad de unión de HEQ hacia IFNAR1, su potencial antiviral es sólo 2 veces mayor que la del IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje. Su actividad antiproliferativa se incrementa en ~ 25 veces si se compara al incremento de 42 veces en la actividad antiproliferativa del IFN - β (Tabla 4). Es cierta también la misma tendencia para MDL (SEC ID N° 10) e YNS (SEC ID N° 11). Mientras que su actividad antiviral es más o menos la misma que la del IFN - $\alpha 2$, su actividad antiviral es mucho mayor. MDL presenta el mismo nivel de actividad que el IFN - β , mientras que YNS presenta un nivel aún más alto de actividad antiproliferativa. El aumento de las actividades antiproliferativas están en línea con las afinidades incrementadas de estos dos IFNs hacia IFNAR1. Como ya se señaló anteriormente, el IFN - β parece frenar el crecimiento más rápidamente si se compara con el IFN - $\alpha 2$. Como resultado, el contador celular tras la aplicación de altas concentraciones de IFN es menor para el IFN - β . Este fenómeno no puede compensarse utilizando una alta concentración de IFN - $\alpha 2$, sino que es una diferencia cualitativa (Figura 4B). En este aspecto, HEQ e YNS se comportan como un IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje y no como un IFN - β . La pendiente de curva de valoración de HEQ (referida a la aparición dependiente de la concentración) se encuentra entre el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje y el IFN - β .

Tabla 4: Actividades biológicas relativas del IFN - α 2 de tipo salvaje, mutantes y IFN - β

5	Actividad antiproliferativa				Actividad antiviral		
	WISH		MDA231		WISH		
	EC50 (nM)	Indice vs IFN - α 2	EC50 (nM)	Indice vs IFN - α 2	EC50 (pM)	Indice vs IFN - α 2	
10	IFN - α 2	2,0	1	0,7	1	0,6	1
	IFN - β	0,03	71	0,07	10	0,3	2,0
10	YNS	0,013	164	0,02	70	0,12	5,0
	MDL	0,085	34			0,6	1,0
	HEQ	0,06	35			0,3	2,0
15	Extremo α 8	0,2	10			0,2	3,0

EJEMPLO 6. Control de la activación de genes utilizando tecnología de chip genético

20 El chip genético se ha convertido en una tecnología estándar para obtener información completa sobre los diferenciales de activación génica. De hecho, se han realizado numerosos estudios para investigar el perfil de la expresión génica sobre la inducción del IFN (de Veer, M. J. et al., 2011, *J Leukoc Biol.* 69, 912 - 920). Se controló el efecto de los IFNs en la expresión génica mediante experimentos de microarrays de oligonucleótidos marcados. Se trataron las células WISH durante 16 h con 0,3 nM de IFN - α 2; 3 nM (10.000 unidades) de IFN - α 2; 0,3 nM de HEQ y 0,15 nM de IFN - β (1.000 unidades). Se escogieron concentraciones para producir > 90 % de una respuesta antiproliferativa (3 nM de IFN - α 2 de tipo salvaje, HEQ e IFN - β) o por debajo del 10 % de la respuesta antiproliferativa (3 nM de IFN - α 2 de tipo salvaje) en las células WISH. En cada condición, el experimento del tratamiento del IFN contra el que no tiene tratamiento se realizó en duplicados de microarrays de dye-swap. Además, se utilizaron como control adicional, cuatro repeticiones de experimentos de microarrays consistentes en los que no tienen tratamiento frente a los que no tienen tratamiento. Se toma como nivel de inducción la ratio normalizada entre los dos colores. Los criterios seleccionados para definir la lista de genes de IFN regulado se describe en la sección de Procedimientos.

35 Los resultados del chip genético pueden analizarse en función de cada gen o examinando las tendencias generales de la inducción génica. La Figura 6 trata de dar una visión general de las tendencias registradas por el cambio en los niveles de expresión de 395 genes del IFN regulado, 16 horas después del tratamiento con IFN - β (0,15), HEQ e IFN - α 2 de tipo salvaje (0,3 nM y 3 nM, respectivamente). En la Figura 6A los niveles de expresión relativos (sin tratamiento) de los 395 genes se marcan en forma ascendente según el número de cambios. Los puntos negros son del chip de control, que contiene sólo una mezcla de las muestras sin tratar en ambos canales de color. Esto, nos presenta una estimación de la fluctuación aleatoria esperada. Los cambios máximos y mínimos en los niveles de expresión registrados para el control del chip fueron de 0,65 - 1,6 veces, con una proporción entre los dos canales de sólo 0,75 - 1,4 para el 95 % de los genes. El bajo nivel de fluctuación aleatoria en la expresión génica presenta un alto nivel de confianza en la calidad de los datos. En general, son similares los niveles de expresión génica para el IFN - β (0,15 nM) y HEQ (0,3 nM) (Figura 6A), mientras que se registró un nivel de inducción mucho más bajo para el IFN - α 2 de tipo salvaje (0,3 nM). La inducción génica tras la adición de 3 nM de IFN - α 2 de tipo salvaje se encuentra entre los niveles registrados para el IFN - α 2 de tipo salvaje (0,3 nM) y el IFN - β (0,15) o HEQ (0,3 nM). Una forma alternativa de análisis de los niveles de expresión diferencial es marcar la proporción del cambio en la activación génica entre los diferentes tratamientos (Figura 6B). Como el IFN - β indujo el cambio más grande, se calcularon todos los demás valores en relación a la inducción del IFN - β . El control es el mismo que para el de la Figura 6A. Una vez más, el IFN - β y el HEQ parecen inducir el mismo nivel de cambio para todos los genes (la línea verde sigue la línea negra que es el control). Esto significa que un gen individual no se comporta diferente en cuanto a la inducción con IFN - β contra HEQ. Este notable resultado muestra la similitud de estos IFNs. La mayor expresión diferencial se encuentra entre el IFN - β y el IFN - α 2 de tipo salvaje (0,3 nM). Una vez más, los resultados para el IFN - α 2 de tipo salvaje (3 nM) se encuentran entre los registrados para el IFN - α 2 de tipo salvaje (0,3 nM) y HEQ.

55 Se realizó el análisis de conglomerado de los genes del IFN inducido para los cuatro tratamientos para dar verificación independiente de los resultados que se presentan en la gráfica en la Figuras 6A y 6B. La Figura 6C muestra que los perfiles de expresión génica del IFN - β y HEQ se agrupan, con una distancia muy corta entre ellos. El perfil de expresión de las células tratadas con 3 nM del IFN - α 2 de tipo salvaje se agrupa rápidamente, mientras que el perfil de la expresión génica de 0,3 nM del IFN - α 2 de tipo salvaje lo hace más lentamente. Los perfiles de expresión génica se encuentran en una excelente concordancia con la actividad biológica diferencial observada entre el IFN - β y el IFN - α 2, y demuestra una vez más que HEQ es un IFN - α 2 con todas las características de IFN - β . Los chips genéticos proporcionan un conocimiento detallado de los niveles de expresión de los genes individuales que comprenden el genoma. Uno de los aspectos más interesantes de analizar el perfil de la expresión génica de IFN - β contra el IFN - α 2 de tipo salvaje es investigar la activación diferencial y la relación entre la activación diferencial y la concentración del IFN (Der, S. D., et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15623 -

15628). Fuera de los 395 genes inducidos, se seleccionaron 59 genes incrementados y 9 genes disminuidos según su nivel diferencial de activación entre los diferentes tratamientos (Jaitin et al., 2006, Mol Cell Biol 26(5): 1888 - 1897, Tabla 3).

5 El efecto en la expresión del IFN - β y HEQ (SEC ID N° 5) en la mayoría de los genes fue mucho más fuerte que el efecto inducido por el IFN - $\alpha 2$ en las concentraciones de actividad antiviral equivalente, es decir; 0,15 y 0,3 nM respectivamente, incluyendo algunos genes que no están influenciados por el IFN - $\alpha 2$ en la concentración de 0,3 nM.

10 **EJEMPLO 7. Modelo de prevención del tumor MDA231**

15 Para establecer tumores subcutáneos (SC), se cultivaron células MDA231 *in vitro* al 70 % de confluencia, se tripsinizaron y suspendieron en un TFS con una concentración de 10^8 células / ml, y se inyectaron 10^7 en el costado de un ratón desnudo. Los ratones fueron aleatorizados y divididos en 3 grupos de tratamiento compuestos cada uno por 6 animales. El régimen de tratamiento se inició el día 1 y continuó hasta el día 34. A los ratones se les inyectó SC con TFS o un tratamiento específico dos veces a la semana durante 34 días. A los 34 días del tratamiento, se sacrificaron los animales, se extirparon los tumores y se determinó el tamaño del tumor. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Los resultados demuestran claramente que, según los experimentos de cultivo tisular, YNS es muy eficaz en la supresión del crecimiento de las células del cáncer de mama MDA231 *in vivo*. Tras 20 34 días de tratamiento con YNS todos los ratones tratados con YNS se encontraban limpios de nódulos, mientras que 5 de los 6 ratones tratados con IFN - $\alpha 2$ y los 6 tratados con TFS tenían nódulos de varios tamaños.

25 **Tabla 5: Los resultados de un modelo de prevención del tumor MDA231**

Tratamiento	TFS				IFN - $\alpha 2$				YNS			
	L	M	S	N	L	M	S	N	L	M	S	N
Días												
1	1	0	0	5			4	2	0	0	6	0
5	1	0	4	0	1	0	5	0	3	0	3	0
8	1	2	2	0	1	0	5	0	3	2	1	0
12	1	2	3	0	0	0	5	1	3	1	2	0
15	3	2	3	0	0	0	5	1	1	3	0	2
18	3	0	3	0	0	0	4	2	1	3	0	2
22	3	1	2	0	0	0	4	2	1	0	0	3
26	3	2	1	0	0	1	4	1	0	0	0	6
29	3	2	1	0	0	1	3	2	0	0	0	6
33	3	2	1	0	0	2	3	1	0	0	0	6
34	3	2	1	0	1	2	2	1	0	0	0	6

40 A los ratones se les inyectaron en el día 0 células MDA231, tras inyecciones de 20 μ g / ratones de los diferentes tratamientos en los tiempos indicados. Se trataron 6 ratones para cada condición experimental. Se calculó a ojo el crecimiento del tumor excepto para el día 34. En el último día (34) se sacrificaron los ratones y se les extrajo y midió el tumor. L, M, S y N representan el tamaño del tumor (se mide entre paréntesis el diámetro en el día 34), L- grande (> 5 mm), M- medio (2,5-5 mm), S - pequeño (<2,5 mm), N - ninguno.

45 **EJEMPLO 8. Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE)**

50 La Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), también conocida como Encefalomiелitis Alérgica Experimental, es un modelo animal de esclerosis múltiple (EM). Se conocen en la disciplina varios modelos de EAE, dependiendo del método de inducción, la raza del animal y el antígeno empleado para inducir la enfermedad. La EAE es una enfermedad autoinmune aguda, crónica recurrente, adquirida, inflamatoria y desmielizante. Las diferentes formas de EAE se asemejan a las diversas formas y estados de la EM.

55 En el presente estudio, la EAE se induce mediante una inyección de la Proteína Básica de Mielina (PBM), un método conocido para modelar la fase aguda de la EM. En este modelo, se observa el inicio de la enfermedad por la aparición de los síntomas clínicos 10 días tras la inducción. La enfermedad progresa y aumenta la puntuación 60 clínica y los picos de unos 15 días y se observó una recuperación espontánea al día 23 tras la inducción de la enfermedad.

65 Se inyectaron SC en las patas traseras con 25 μ g de proteína básica de mielina de cobayas (PBM, Sigma) emulsionado en 0,1 ml de Adyuvante Completo de Freund (Difco) a ratas Lewis hembra (promedio del peso corporal 130 - 180 g, Harlan, Israel). Se mantuvieron los animales en un régimen de luz unas 12 h y en un régimen oscuro otras 12 h a una temperatura constante de 22° C con comida y agua *ad libitum*. Los animales son objeto de

seguimiento en una base diaria a partir del día 8 tras la inducción. Se registran los resultados en una puntuación clínica, un marcador de 0 indica un animal normal sin signos clínicos, 0,5 indica una pérdida de tonicidad en la parte del distal de la cola, 1 indica parálisis en la cola, 1,5 indica debilidad en una pata trasera, 2 indica debilidad en ambas patas, 2,5 indica debilidad en una pata delantera, 3 indica parálisis en las cuatro patas, 4 indica parálisis completa en todo el cuerpo y estado moribundo y 5 indica muerte. Se registra la puntuación clínica de los animales durante ~ 15 días después del inicio de la enfermedad hasta el final de los 25 días del estudio tras la inducción y se calcula el área bajo la curva (ROC) durante este periodo de tiempo.

Los animales que muestran síntomas de enfermedad, lo que podría anotarse clínicamente entre 0,5 y 1, se tratan con composiciones de HEQ (SEC ID N° 5), YNS (SEC ID N° 11) o controles de vehículos durante tres días consecutivos a partir del inicio de la enfermedad (~ al día 9 - 11 tras la inducción de la enfermedad). Se evalúan varias vías de administración, por ejemplo, por vía intravenosa (en vehículo) o por vía oral mediante sonda (en vehículo) en una dosis de volumen de 5 ml / kg. En el último día de estudio (aproximadamente en el día 25) se sacrifican a los animales con 100 mg / kg de pentobarbitona sódica por vía intraperitoneal.

Se expresan los resultados como medio \pm SEM y se analizaron las diferencias entre los grupos de tratamiento mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. Se consideró un valor de $p < 0,05$ para ser estadísticamente significativo y se indicó en la figura mediante un asterisco en el grupo de tratamiento relevante.

Se establece la validez del modelo utilizando metilprednisolona como control positivo. Cuando se administró el esteroide durante 5 días consecutivos por vía intravenosa a 30 mg / kg, a partir del día de la inducción de la enfermedad mediante la inyección de TFS, se informó de una reducción del 34 % en la ROC.

EJEMPLO 9. Un modelo animal de lupus eritematoso sistémico (LES)

Los ratones híbridos hembra (NZB X NZW)_{F1} (denominados a partir de ahora como "ratones NZB / W), desarrollan espontáneamente una enfermedad de tipo lupus caracterizada por la presencia de anticuerpos séricos de ADN bicatenario (dsADN). Estos ratones, que finalmente experimentan una insuficiencia renal total, se utilizan a menudo como modelo para la experimentación dirigida a una mejor comprensión y tratamiento del lupus en humanos. Con el tiempo, esta condición en los ratones NZB / W desarrolla un mal funcionamiento renal que se manifiesta por la aparición de proteinuria.

Se utilizan ratones hembra de 32 semanas de edad en un experimento para determinar si NLYY (SEC ID N° 6) puede retrasar el desarrollo de la enfermedad de tipo lupus. Se dividen los ratones en dos grupos y se trata en días alternos con NLYY administrado por inyección intraperitoneal (grupo de 10 ratones) o ratas IgG como un control (grupo de 10 ratones). Se continuaron con los tratamientos durante cinco semanas y se evaluaron semanalmente los ratones por la presencia de la proteinuria.

Se describen, además en la presente, los siguientes puntos:

1. Un polipéptido de interferón $\alpha 2$ recombinante, un fragmento activo, un análogo, un derivado y una variante de los mismos, dicho polipéptido comprende una mutación seleccionada de al menos una sustitución de aminoácidos en los residuos de aminoácidos 57 - 89, en al menos una sustitución de aminoácidos de los residuos aminoácidos de C-terminal 159 - 165, y combinaciones de los mismos, en el que dicho polipéptido ha mejorado la actividad agonista o antagonista específica, si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
2. Un polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende al menos una mutación seleccionada del grupo de H57A (SEC ID N° 24); E58A (SEC ID N° 25), Q61A (SEC ID N° 26), H57Y (SEC ID N° 27), E58N (SEC ID N° 28), Q61S (SEC ID N° 29) y combinaciones de los mismos, en el que dicho polipéptido ha mejorado la actividad agonista o antagonista si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
3. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende un mutante triple H57A, E58A, Q61A (SEC ID N° 5) que tiene una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
4. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende un mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6) que tiene una actividad antagonista si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
5. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende una sustitución del C-terminal ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 7) que tiene una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).

6. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende una combinación del mutante triple H57A, E58A y Q61A y una sustitución del C-terminal ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 8) que tiene una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
- 5 7. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende una combinación del mutante cuádruple N65A, L80A, Y85A, Y89A (SEC ID N° 6) y una sustitución del C-terminal ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 9) que tiene una actividad antagonista si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
- 10 8. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende un mutante triple H57M, E58D, Q61L (SEC ID N° 10) que tiene una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
- 15 9. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende un mutante triple H57Y, E58N, Q61S (SEC ID N° 11) que tiene una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
- 20 10. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende una combinación del mutante triple H57M, E58D y Q61L y una sustitución del C-terminal ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 12) que tiene una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
- 25 11. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido comprende una combinación del mutante triple H57Y, E58N y Q61S y una sustitución del C-terminal ESLRSKE a KRLKSKE (SEC ID N° 13) que tiene una actividad específica mejorada si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
12. El polipéptido según el punto 1, en el que dicho polipéptido es además conjugado con PEG.
- 30 13. Una molécula que codifica a un polipéptido que comprende una mutación seleccionada de al menos una sustitución de aminoácidos en los residuos de aminoácidos 57 - 89, en al menos una sustitución de aminoácidos de los residuos aminoácidos de C-terminal 159 - 165, y combinaciones de los mismos, en el que dicho polipéptido ha mejorado la actividad agonista o antagonista específica si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2).
- 35 14. La molécula de ADN según el punto 13, en el que la molécula de ADN comprende una secuencia seleccionada del grupo de las SEC ID N° 15 - 23 y las SEC ID N° 30 - 35.
- 40 15. Un vector que comprende una molécula de ADN según cualquiera de los puntos 13 - 14, operablemente unido a uno o más elementos de control de transcripción.
16. Una célula huésped que comprende el vector del punto 15.
- 45 17. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un polipéptido de interferón $\alpha 2$ recombinante, un fragmento activo, un análogo, un derivado y una variante de los mismos, dicho polipéptido comprende una mutación seleccionada de al menos una sustitución de aminoácidos en los residuos de aminoácidos 57 - 89, en al menos una sustitución de aminoácidos de los residuos aminoácidos de C-terminal 159 -165, y combinaciones de los mismos, en el que dicho polipéptido ha mejorado la actividad agonista o antagonista específica si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2) que además comprende un vehículo aceptable farmacéuticamente.
- 50 18. La composición farmacéutica según el punto 17 que comprende un polipéptido de interferón $\alpha 2$ recombinante (IFN - $\alpha 2$) que tiene cualquiera de las SEC ID N° 5 - 13 y las SEC ID N° 24 - 29 fragmentos, análogos, derivados y variantes de los mismos.
- 55 19. La composición farmacéutica según el punto 17 que comprende un polipéptido de interferón $\alpha 2$ recombinante (IFN - $\alpha 2$) que tiene cualquiera de las SEC ID N° 5, 7, 8, 10, 11, 12, y 13, fragmentos, análogos, derivados y variantes de los mismos, en el que dicho polipéptido ha mejorado la actividad agonista específica.
- 60 20. La composición farmacéutica según el punto 18 que comprende un polipéptido de interferón $\alpha 2$ recombinante (IFN - $\alpha 2$) que tiene cualquiera de las SEC ID N° 6 y 9, fragmentos, análogos, derivados y variantes de los mismos, en el que dicho polipéptido ha mejorado la actividad antagonista específica.
- 65 21. Un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad asociado con la modulación del interferón (IFN) que comprende la administración a un sujeto que necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica del punto 19, en el que dicho trastorno o

enfermedad se selecciona del grupo formado por cáncer, de la enfermedad autoinmune y de la enfermedad infecciosa.

- 5 22. El procedimiento según el punto 21 en el que dicho cáncer se selecciona del grupo formado por leucemia de células pilosas, el sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, linfoma de no Hodgkin y melanoma.
- 10 23. El procedimiento según el punto 21 en el que dicha enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple (EM)
24. El procedimiento según el punto 23 en el que dicha EM se selecciona del grupo formado por la EM remitente-recidivante, EM progresiva secundaria, EM progresiva primaria y EM progresiva de recaída.
- 15 25. El procedimiento según el punto 21 en el que dicha enfermedad infecciosa es la infección por virus de la hepatitis.
26. El procedimiento según el punto 25 en el que dicho virus de la hepatitis se selecciona del grupo formado por la hepatitis A, la hepatitis B y la hepatitis C.
- 20 27. Un procedimiento de tratamiento o prevención de trastornos asociados con el aumento de la expresión del IFN - $\alpha 2$ que comprende la administración a un sujeto que necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según el punto 20.
28. El procedimiento del punto 27 en el que dicho trastorno es la diabetes mellitas insulino dependiente (DMID).
- 25 29. El procedimiento del punto 27 en el que dicho trastorno es el lupus eritematoso sistémico (LES)
- 30 30. Utilización de un polipéptido de interferón $\alpha 2$ recombinante, un fragmento activo, un análogo, un derivado y una variante de los mismos, dicho polipéptido comprende una mutación seleccionada de al menos una sustitución de aminoácidos en los residuos de aminoácidos 57 - 89, en al menos una sustitución de aminoácidos de los residuos aminoácidos de C-terminal 159 - 165, y combinaciones de los mismos, en el que dicho polipéptido ha mejorado la actividad agonista o antagonista específica si se compara con el IFN - $\alpha 2$ de tipo salvaje (SEC ID N° 2) para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de los trastornos o enfermedades asociadas con la modulación del IFN.
- 35 31. Utilización de un mutante de interferón $\alpha 2$ (IFN - $\alpha 2$), según cualquiera de los puntos 2 - 12 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de los trastornos o enfermedades asociadas con la modulación del IFN.

Lista Secuencial

- 40 <110> **Yeda Research and Development Co. Ltd.**
- 45 <120> **Mutantes de interferón alfa 2 recombinante (IFN- $\alpha 2$)**
- <130> **N3297 EP S3**
- 50 <140> **EP 06 75 6232.2**
- <141> **2006-06-28**
- <150> **US 60/694,810**
- <151> **2005-06-29**
- 55 <160> **35**
- <170> **Patente en versión 3.4**
- 60 <210> **1**
- <211> **166**
- <212> **PRT**
- <213> **Homo sapiens**

65

ES 2 435 846 T3

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

50 <210> 2
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 2

60

65

5 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

10 Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

15 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

20 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

25 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

30 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

35 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

40 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

45 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

50 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

55 Leu Arg Ser Lys Glu
 165

<210> 3
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

65

<210> 4
 <211> 165
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 10 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15
 15 Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
 20 20 25 30
 20 Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 35 40 45
 25 Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Glu Glu Ser Asp Arg
 50 55 60
 30 Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys
 65 70 75 80
 35 Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys
 85 90 95
 40 Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp
 100 105 110
 45 Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln
 115 120 125
 50 Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro
 130 135 140
 55 Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly
 145 150 155 160
 60 Arg Arg Ala Ser Gln
 165
 65

5 <210> 5
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota=\224 Descripción de secuencia artificial: mutante triple
 H57A, E58A, Q61A de IFN alfa 2 \224

15 <400> 5

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

45 <210> 6
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224 Descripción de Secuencia Artificial: Mutante Cuadruple N65A, L80A, Y85A, Y89A de
 IFNalpha2\224

55 <400> 6

60

65

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

<210> 7

<211> 165

<212> PRT

<213> Artificial

55

<220>

<221> Salida

<223> /nota=224 Descripcion de Secuencia Artificial: Mutante con sustitucion de la terminal C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2V224

60

<400> 7

65

5 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

10 Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

15 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

20 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

25 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

30 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

35 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

40 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

45 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

50 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Lys Arg
 145 150 155 160

Leu Lys Ser Lys Glu
 165

55 <210> 8
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\ 224Descripcion de Secuencia Artificial: Triple mutanteH57A,E58A, Q61A con sustitucion de la terminal
 C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224

65 <400> 8

ES 2 435 846 T3

5 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15
 10 Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30
 15 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45
 20 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu Ala Ala Met Ile Ala Gln Ile Phe
 50 55 60
 25 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80
 30 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 35 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 40 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 45 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 50 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Lys Arg
 145 150 155 160
 Leu Lys Ser Lys Glu
 165
 50 <210> 9
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224 Descripcion de Secuencia Artificial: cuadruple mutante N65A, L80A, Y85A, Y89A con sustitucion
 de la terminal C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224
 60 <400> 9
 65

ES 2 435 846 T3

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

<210> 10
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=224 Descripcion de Secuencia Artificial: Triple mutante H57M, E58D, Q61L de IFNalpha2\224

<400> 10

5 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

10 Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

15 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

20 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu Met Asp Met Ile Leu Gln Ile Phe
50 55 60

25 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

30 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

35 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

40 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

45 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

50 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 11

<211> 165

<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

<221> Salida

60 <223> /nota=\224 Descripcion de Secuencia Artificial: Triple mutant eH57Y, E58N, Q61S de IFNalpha2\224

<400> 11

65

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu Tyr Asn Met Ile Ser Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

55 <210> 12
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <221> Salida
 <223> /nota=224 Descripción de Secuencia Artificial: Triple mutante H57M, E58D, Q61L Con sustitución de la Terminal C ESLRSKE a KRLKSKE delFNalpha224

65 <400> 12

ES 2 435 846 T3

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

50 <210> 13
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <221> Salida
 55 <223> /note=\224 Descripcion de Secuencia Artificial: Triple mutante H57Y, E58N, Q61S Con sustitución de la Terminal C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224
 <400> 13

60

65

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

<210> 14

<211> 69

<212> ADN

55 <213> Artificial

<220>

<221> Salida

60 <223> /nota=224 Descripcion de Secuencia Artificial: AND mutatedo secuenciae de los primeros 23 aminoacidos de IFNalpha2\224

<400> 14

65

ES 2 435 846 T3

	tgtgatctgc cgcagactca ctctctgggt tctcgtcgtc ctctgatgct gctggctcag	60
	atgcgtcgt	69
5	<210> 15 <211> 501 <212> AND <213> Artificial	
10	<220> <221> Salida <223> /nota=\ 224Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia ADN de triple mutante H57A, E58A, Q61A de IFNalpha2\224	
15	<400> 15	
20	atgtgtgatc tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct	60
	cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc	120
	caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct cgctgcgatg	180
25	atcgcgcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc	240
	ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg	300
30	atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg	360
	aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc	420
35	tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa	480
	agtttaagaa gtaaggaatg a	501
40	<210> 16 <211> 501 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <221> Salida <223> /nota=\ 224Descripción de Secuencia Artificial: secuencia ADN sequence de cuadruple mutante N65A, L80A, Y85A, Y89A de IFNalpha2\224	
50	<400> 16	
55		
60		
65		

ES 2 435 846 T3

atgtgtgatc tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct 60
 5 cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120
 caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg 180
 atccagcaga tcttcgctct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
 10 gccctagaca aattcgccac tgaactcgcc cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
 atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360
 15 aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
 tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa 480
 20 agtttaagaa gtaaggaatg a 501

<210> 17
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=224 Descripcion de Secuencia Artificial: ADN secuencia de mutante con sustitucion de la terminal
 30 C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224
 <400> 17

35 atgtgtgatc tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct 60
 cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120
 40 caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg 180
 atccagcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
 45 ctctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
 atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360
 aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
 50 tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa 480
 aggttaaaaa gtaaggaatg a 501

55

60

65

ES 2 435 846 T3

<210> 18
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224 Descripcion de Secuencia Artificial: secuencia de ADN de triple mutante H57A, E58A, Q61 A con sustitucion de la terminal C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224

10

<400> 18

	atgtgtgac	tgccgcagac	tcactctctg	ggttctcgtc	gtactctgat	gctgctggct	60
15	cagatgcgtc	gtatctctct	tttctcctgc	ttgaaggaca	gacatgactt	tggatttccc	120
	caggaggagt	ttggcaacca	gttccaaaag	gctgaaacca	tcctgtcct	cgctgcgatg	180
20	atcgcgcaga	tcttcaatct	cttcagcaca	aaggactcat	ctgctgcttg	ggatgagacc	240
	ctcctagaca	aattctacac	tgaactctac	cagcagctga	atgacctgga	agcctgtgtg	300
	atacaggggg	tgggggtgac	agagactccc	ctgatgaagg	aggactccat	tctggctgtg	360
25	aggaaatact	tccaaagaat	cactctctat	ctgaaagaga	agaaatacag	cccttgtgcc	420
	tgggaggttg	tcagagcaga	aatcatgaga	tctttttctt	tgtcaacaaa	cttgcaaaaa	480
30	aggttaaaaa	gtaaggaatg	a				501

<210> 19
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

35

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224 Descripcion de Secuencia Artificial : secuencia de ADN de cuádruple mutante N65A, L80A, Y85A, Y89A con sustitucion de la terminal C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224

40

<400> 19

45	atgtgtgac	tgccgcagac	tcactctctg	ggttctcgtc	gtactctgat	gctgctggct	60
	cagatgcgtc	gtatctctct	tttctcctgc	ttgaaggaca	gacatgactt	tggatttccc	120
	caggaggagt	ttggcaacca	gttccaaaag	gctgaaacca	tcctgtcct	ccatgagatg	180
50	atccagcaga	tcttcgctct	cttcagcaca	aaggactcat	ctgctgcttg	ggatgagacc	240
	gccctagaca	aattcgccac	tgaactcgcc	cagcagctga	atgacctgga	agcctgtgtg	300
55	atacaggggg	tgggggtgac	agagactccc	ctgatgaagg	aggactccat	tctggctgtg	360
	aggaaatact	tccaaagaat	cactctctat	ctgaaagaga	agaaatacag	cccttgtgcc	420
60	tgggaggttg	tcagagcaga	aatcatgaga	tctttttctt	tgtcaacaaa	cttgcaaaaa	480
	aggttaaaaa	gtaaggaatg	a				501

65

ES 2 435 846 T3

5 <210> 20
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224 Descripcion de Secuencia Artificial: secuencia de ADN de triple mutante H57M, E58D, Q61L de IFNalpha2\224

10 <400> 20

```

  15  atgtgtgatac tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct      60
     cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
     caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct catggatatg      180
     atcctacaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
     ctctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
     atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
     25  aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc      420
     tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
     30  agtttaagaa gtaaggaatg a                                          501
  
```

35 <210> 21
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\ 224 Descripcion de Secuencia Artificial: secuencia de ADN de triple mutant eH57Y, E58N, Q61S de IFNalpha2\224

40 <400> 21

```

  45  atgtgtgatac tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct      60
     cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc      120
     50  caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ctataacatg      180
     atctctcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc      240
     55  ctctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg      300
     atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg      360
     60  aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc      420
     tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa      480
     65  agtttaagaa gtaaggaatg a                                          501
  
```

ES 2 435 846 T3

<210> 22
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial: Secuencia de ADN de triple mutante H57M, E58D, Q61L con sustitucion de la terminal C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224

10

<400> 22

15 **atgtgtgatac tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct 60**
cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct catggatatg 180
 20 **atcctacaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240**
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
 25 **atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360**
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
 30 **tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa 480**
aggttaaaaa gtaaggaatg a 501

35 <210> 23
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Artificial

40

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial : secuencia de AND de triple mutante H57Y, E58N, Q61S con sustitucion de la terminal C ESLRSKE a KRLKSKE de IFNalpha2\224

45 <400> 23

atgtgtgatac tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct 60
 50 **cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120**
caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ctataacatg 180
 55 **atctctcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240**
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360
 60 **aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420**
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaaaaa 480
 65 **aggttaaaaa gtaaggaatg a 501**

ES 2 435 846 T3

<210> 24
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial: Mutant eH57A de IFNalpha2\224

10

<400> 24

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

20

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

25

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu Ala Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

30

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

35

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

40

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

45

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

50

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

55

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

60

Leu Arg Ser Lys Glu
165

65

ES 2 435 846 T3

<210> 25
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial: Mutante E58A de IFNalpha2\224

10 <400> 25

15 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

20 Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

25 Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

30 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Ala Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

35 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

40 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

45 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110

50 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

55 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140

60 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160

65 Leu Arg Ser Lys Glu
 165

ES 2 435 846 T3

<210> 26
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial: Mutante Q61 A of IFNalpha2\224

10

<400> 26

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

65

ES 2 435 846 T3

<210> 27
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial: Mutante H57Y of IFNalpha2\224

10

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial: Mutante E58N of IFNalpha2\224

10

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial: Mutante Q61S of IFNalpha2\224

10

<400> 29

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

20

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

25

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Ser Gln Ile Phe
50 55 60

30

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

35

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

40

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

45

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

50

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

55

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

60

Leu Arg Ser Lys Glu
165

65

ES 2 435 846 T3

<210> 30
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial:secuencia de ADN de mutante H57A de IFNalpha2\224

10 <400> 30

	atgtgtgatac tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct	60
15	cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc	120
	caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtcct cgctgagatg	180
20	atccagcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc	240
	ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg	300
25	atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg	360
	aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc	420
	tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa	480
30	agtttaagaa gtaaggaatg a	501

<210> 31
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Artificial

35

<220>
 <221> Source
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial:secuencia de ADN de mutante E58A of IFNalpha2\224

40

<400> 31

45	atgtgtgatac tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct	60
	cagatgcgtc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc	120
50	caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tcctgtcct ccatgcatg	180
	atccagcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc	240
	ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg	300
55	atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg	360
	aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc	420
60	tgggagggtg tcagagcaga aatcatgaga tcttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa	480
	agtttaagaa gtaaggaatg a	501

65

ES 2 435 846 T3

<210> 32
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223> /nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial:secuencia de ADN de mutante Q61A of IFNalpha2\224

10 <400> 32

	atgtgtgata tgcgcagac tcaactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct	60
15	cagatgctgc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc	120
	caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg	180
20	atcgcgcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc	240
	ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg	300
25	atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg	360
	aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc	420
	tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa	480
30	agtttaagaa gtaaggaatg a	501

<210> 33
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

35

<220>
 <221> Salida
 <223>/nota=\224Descripcion de Secuencia Artificial:secuencia de ADN de mutante H57Y of IFNalpha2\224

40 <400> 33

	atgtgtgata tgcgcagac tcaactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct	60
45	cagatgctgc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc	120
	caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ctatgagatg	180
50	atccagcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc	240
	ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg	300
55	atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg	360
	aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc	420
	tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa	480
60	agtttaagaa gtaaggaatg a	501

65

ES 2 435 846 T3

<210> 34
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Salida
 <223>/nota=1224Descripcion de Secuencia Artificial:secuencia de ADN de mutante E58N of IFNalpha2\224

10 <400> 34

```

atgtgtgata tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct 60
cagatgcgctc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120
caggaggagt ttggcaacca gttcctaaaag gctgaaacca tcctgtcct ccataacatg 180
atccagcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa 480
agtttaagaa gtaaggaatg a 501
    
```

<210> 35
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Artificial

35

<220>
 <221> Source
 <223>/nota=1224Descripcion de Secuencia Artificial:secuencia de ADN de mutante Q61S of IFNalpha2\224

40

<400> 35

```

atgtgtgata tgccgcagac tcactctctg ggttctcgtc gtactctgat gctgctggct 60
cagatgcgctc gtatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc 120
caggaggagt ttggcaacca gttcctaaaag gctgaaacca tcctgtcct ccatgagatg 180
atctctcaga tcttcaatct cttcagcaca aaggactcat ctgctgcttg ggatgagacc 240
ctcctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg 300
atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg 360
aggaaatact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag cccttgtgcc 420
tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa 480
agtttaagaa gtaaggaatg a 501
    
```

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ADN seleccionada del grupo de las SEC ID N° 20, SEC ID N° 21, SEC ID N° 22 y SEC ID N° 23.
2. El polipéptido del interferón $\alpha 2$ (IFN - $\alpha 2$) mutante codificado por una molécula de ADN de la reivindicación 1.
3. El polipéptido según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido es conjugado además con PEG.
- 10 4. Un vector que comprende la molécula de ADN según la reivindicación 1, operablemente unida a uno o más elementos de control de transcripción.
5. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 4.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un polipéptido mutante de IFN - $\alpha 2$ recombinante según la reivindicación 2 o 3, que comprende además opcionalmente un vehículo aceptable farmacéuticamente.
- 20 7. El polipéptido según la reivindicación 2 o 3 para uso como agente terapéutico.
8. Utilización del polipéptido según la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer, en el que dicho cáncer se selecciona a partir del grupo formado por leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, linfoma de no Hodgkins y melanoma.
- 25 9. El polipéptido según la reivindicación 2 o 3 o la composición farmacéutica según la reivindicación 6 para la utilización en el tratamiento o la prevención del cáncer, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo formado por leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, linfoma de no Hodgkins y melanoma.
- 30 10. Utilización del polipéptido según la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple (EM).
- 35 11. El polipéptido según la reivindicación 2 o 3 o la composición farmacéutica según la reivindicación 6 para la utilización para el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple (EM).
- 40 12. La utilización según la reivindicación 10, el polipéptido para la utilización en el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple (EM) según la reivindicación 11 o la composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple (EM) según la reivindicación 11, en el que dicha EM se selecciona del grupo formado por la EM remitente-recidivante, EM progresiva secundaria, EM progresiva primaria y EM progresiva de recaída.
- 45 13. Utilización del polipéptido según la reivindicación 2 o 3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la infección por virus de la hepatitis.
- 50 14. El polipéptido según la reivindicación 2 o 3 o la composición farmacéutica según la reivindicación 6 para la utilización en el tratamiento o la prevención de la infección por virus de la hepatitis.
15. La utilización según la reivindicación 13, el polipéptido para la utilización en el tratamiento o la prevención de la infección por virus de la hepatitis según la reivindicación 14 o la composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento o la prevención de la infección por virus de la hepatitis según la reivindicación 14 en el que dicho virus de la hepatitis se selecciona del grupo formado por la hepatitis A, la hepatitis B y la hepatitis C.

Figura 1

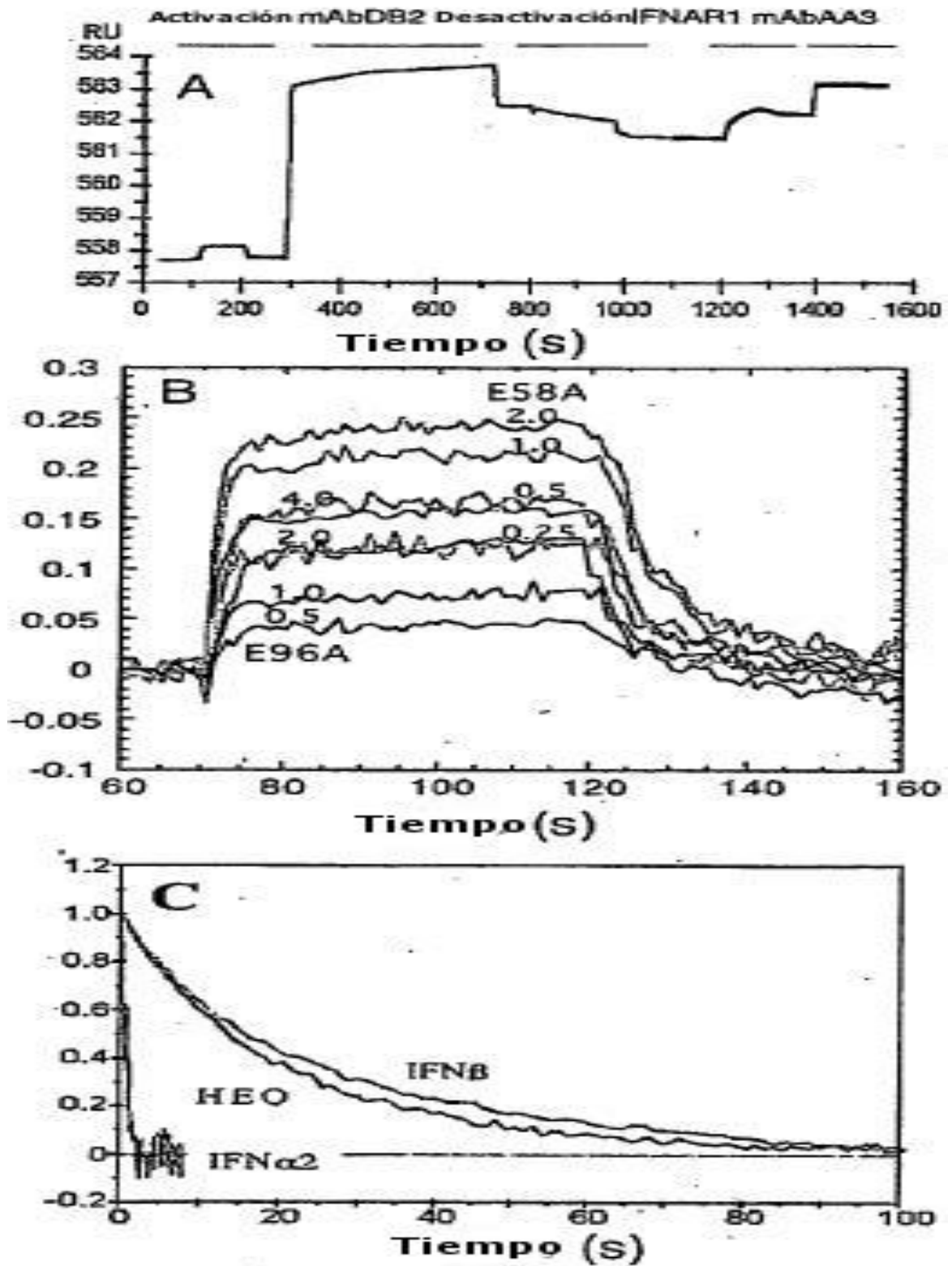


Figura 2

Receptor		-	--	-----
		2	22	22222
IFNa2	1	--CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMR-KISLFSCLKDRHDFGFPQEEF-GNQFQKAETIPVL		
IFNa5	1	---.....H...M.....R.....R.....D.....A.S..		
IFNa13	1	---...E...DN.....S-R..PS...M.....D.....PA.S..		
IFNa1	1	---.....N..A.I....G-R.PP.....D.....QA.S..		
IFNa21	1	---.....N..A.I....G-R..P.....D.....QA.S..		
IFNa4	1	---.....N..A.I....G-R..H.....E..D.H...TQA.S..		
IFNa7	1	---.....RN..A.I....G-R..P.....E.R..E..D.H...TQA.S..		
IFNa10	1	---.....N..A.I..G..G-R..P.....RI.....D.....QA.S..		
IFNa14	1	---N.S.....NN.....M.....-R..P.....E.....D.....QA.S..		
IFNa16	1	---.....N..A.I....G-R..H.....Y.....V.D.....QASAF		
IFNa8	1	---.....N..A.I....-R..P.....E.....DDK....QA.S..		
IFNo	1	---.....N.G.L..N..V..H...-R..P.L....R..R...MVK.S.L...HVMS..		
IFNβ	1	SYNL.GFLQRSSNFQCQK..W.LNGRLEY--.....MN.DI.E.IKQLQ....EDAALTI		

Receptor		++	+	--	-	-	-	-
		11	1	11	1	1	1	1
IFNa2	57	HEMIGQIPNLPSTKDS	AAWDETLLDKFYTEIY	QQLNDLEACVIQGVGV	TETPLMKEDSI			
IFNa5	58	V..T.....V...R...I.....M.E.W.GG...N....						
IFNa13	58	L.....T.....D...C.....M.EER.G...NA...						
IFNa1	58	T.....T.EQS..E.S..N.....E..E...NV...						
IFNa21	58	T.....T.EQS..E.S..N.....M.....E..E...NV...						
IFNa4	58	T.....E.....EQS..E.S.....E..E...NV...						
IFNa7	58	T.....E.....EQS..E.S.....E..E...N..F.						
IFNa10	58	T.....E.....EQS..E.S.....E..E...N....						
IFNa14	58	M..T.....N.....E..I..F..M.....E..E...N....						
IFNa16	58	T.....I..F.....T.E...E.IA..N....						
IFNa8	58	T.....L.....E..I..D.....S..M.E...I.S...Y....						
IFNo	58	L...S..H.ER...NM...QLH.G.H...QH..T.LL.V..EG.SAGAISSPA						
IFNβ	59	K..I..N..AI.RQDS..TG..N..IVENLLANV..E.I.H.KTVLEEKLEKEDFTRG.LM.S						

Receptor		-	-	---	--	++	+
		2	2	222	22	22222	
IFNa2	117	LAVRKYFORITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSPSLSTNLOESLRSKE					
IFNa5	118T.....S.R...R.R..-----					
IFNa13	118	...K...R.....T.....L.....R.R..-----					
IFNa1	118	...K.....T.....KIP..R.R..-----					
IFNa21	118	...K.....T.....KIP..R.R..-----					
IFNa4	118T.....L.F....KR..R.D-----					
IFNa7	118M.....F.....-----					
IFNa10	118I.R.....L.F....KR..R..-----					
IFNa14	118	...K.....M.....F.....KR..R..-----					
IFNa16	118MG.....F.....KG..R..-----					
IFNa8	118T.....S.....I...KR..K..-----					
IFNo	118	.TL.R...G.RV.....D.....M...K.LF...M...R....DRDLGSS					
IFNβ	119	.HLKR.YG..LH...A.E..H...TI..V..L.N.YPINR.TGY..N-----					

Figura 3A

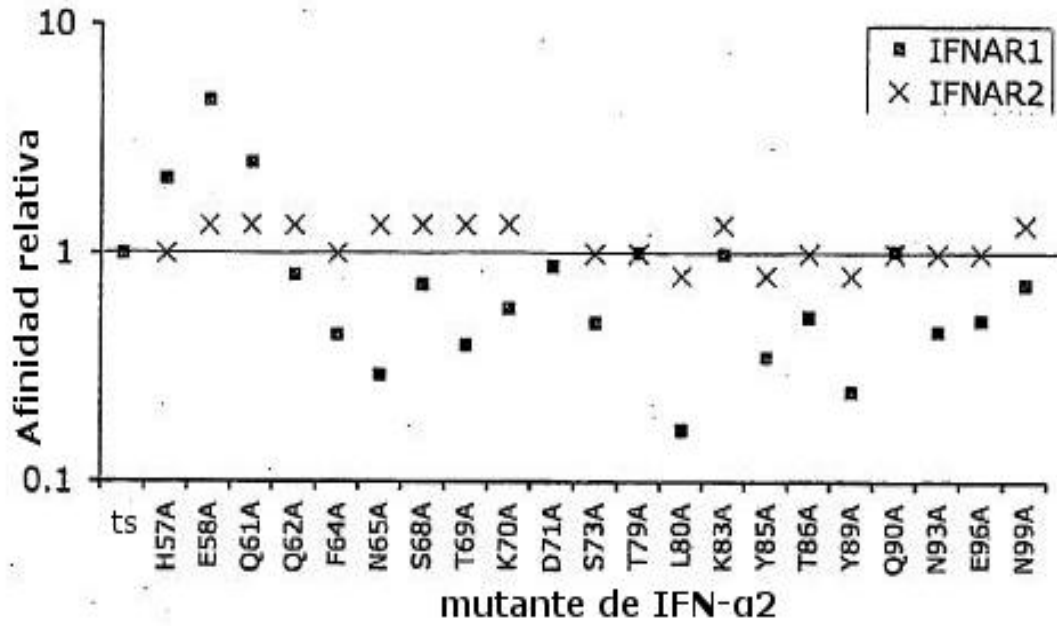


Figura 3B

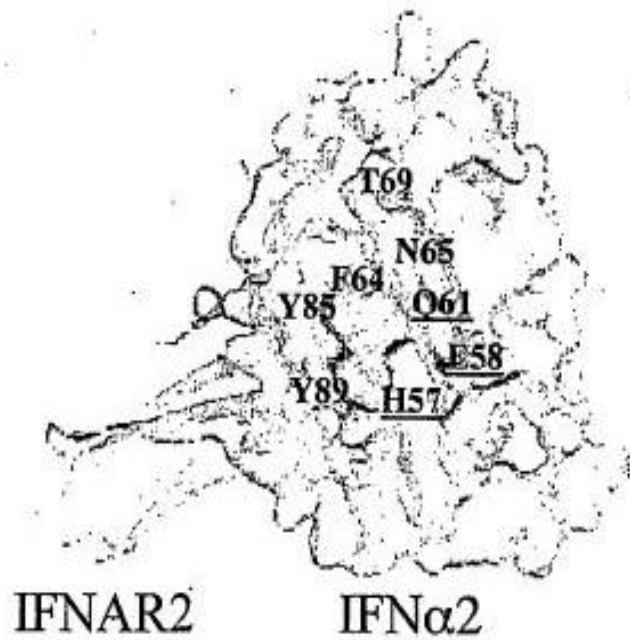


Figura 4

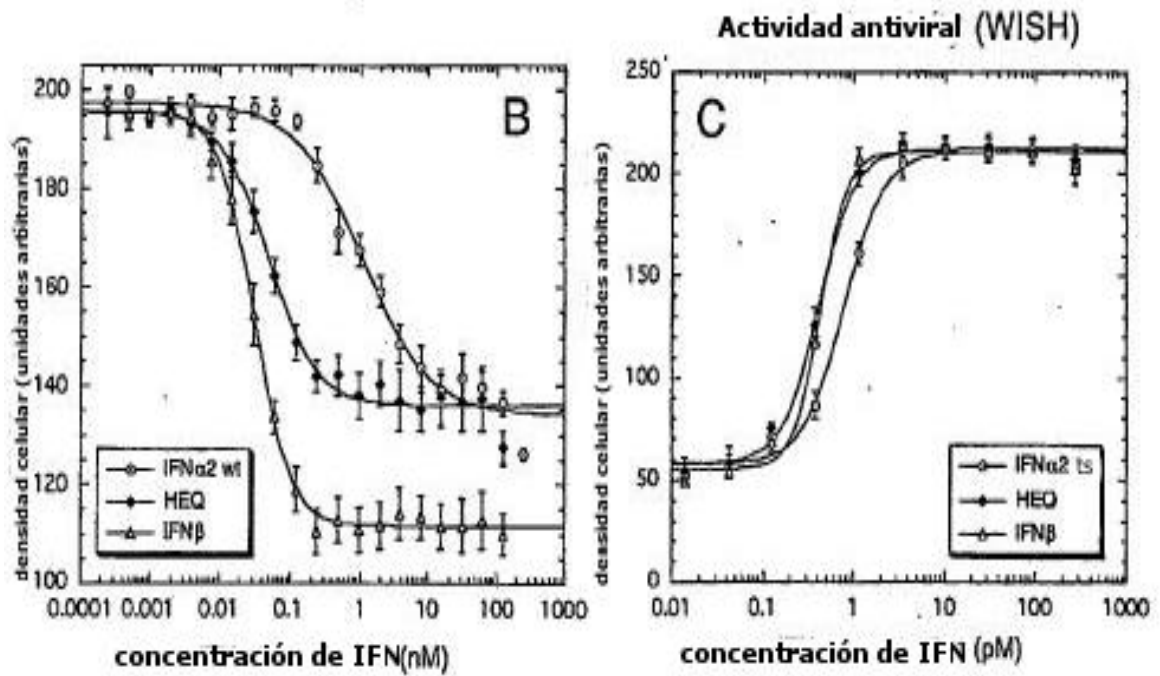


Figura 5

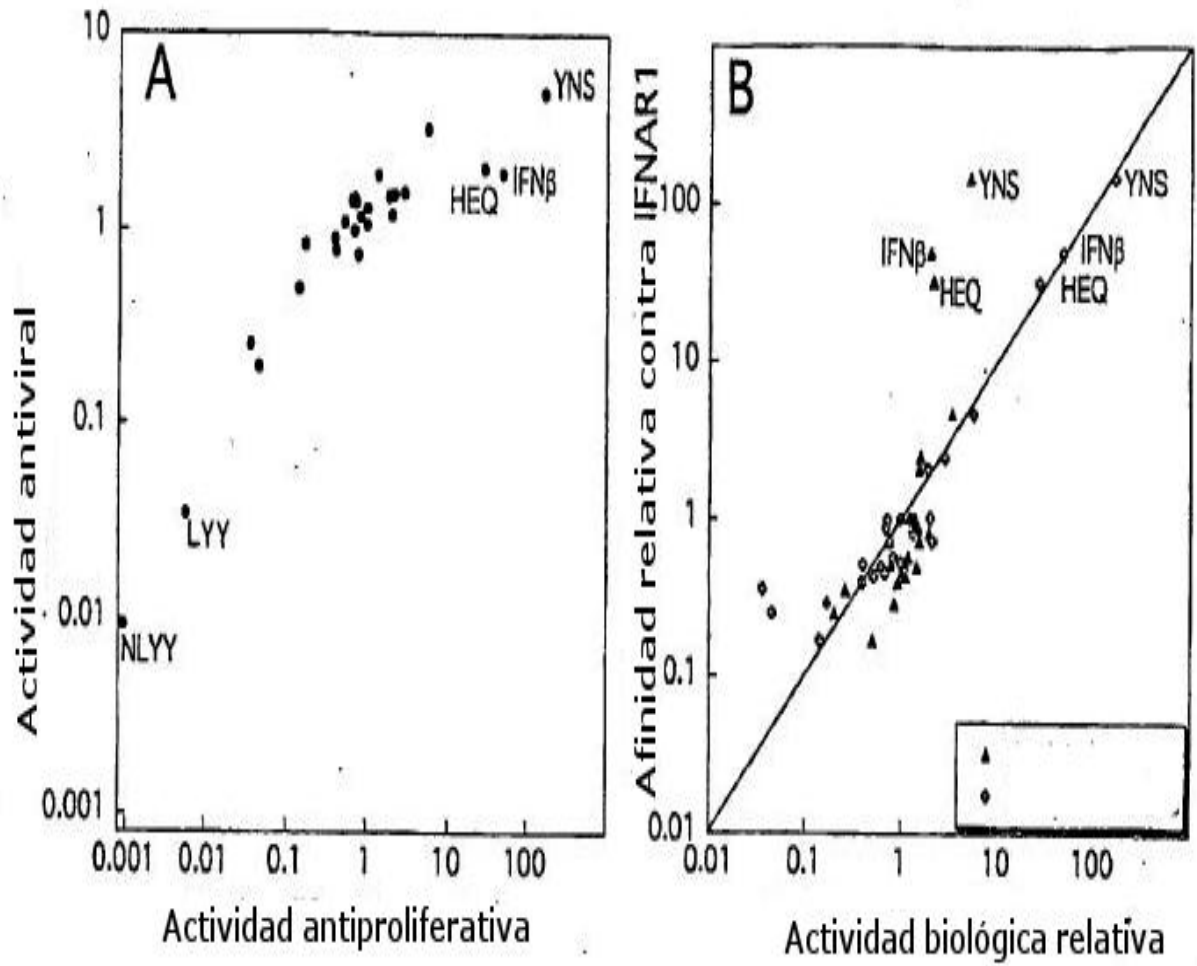


Figura 6

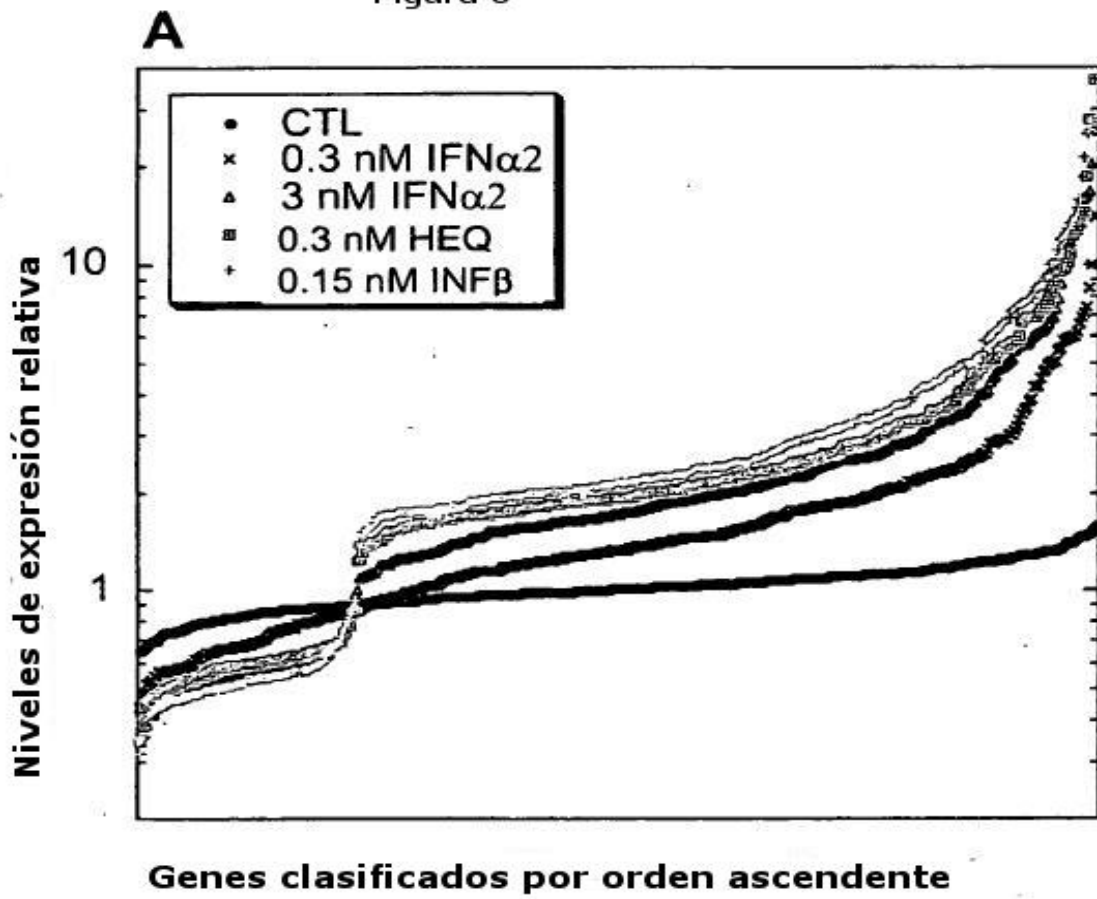


Figura 6 continuación

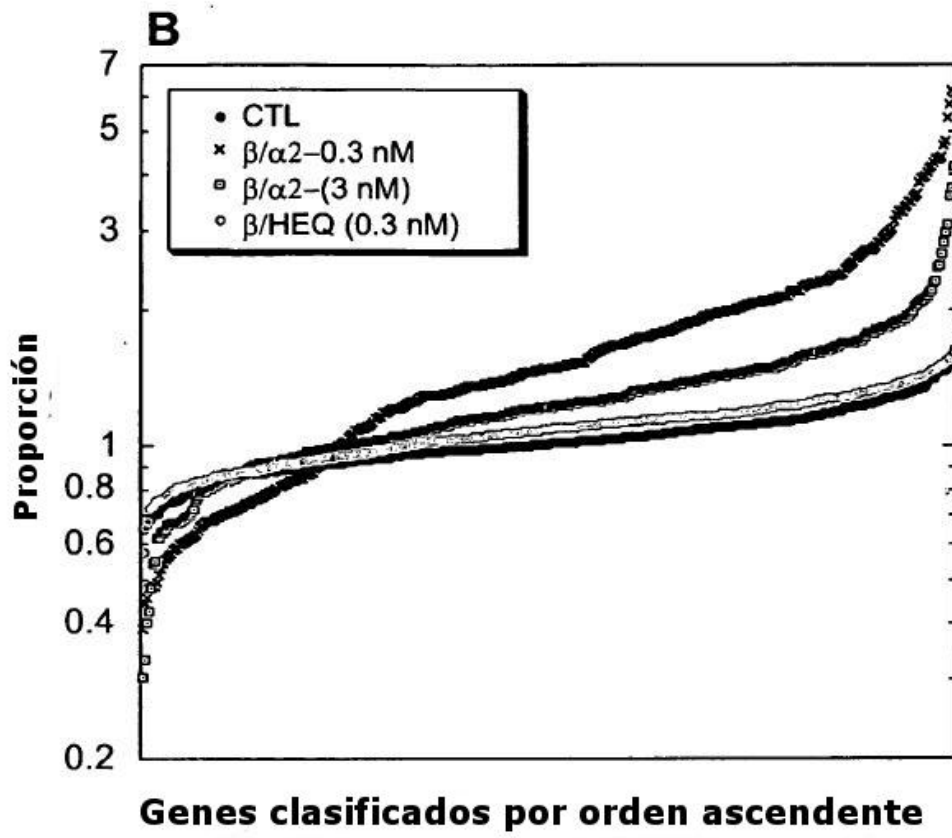


Figura 6 continuación

